

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Fatores Genéticos e Bioquímicos Moduladores do Fenótipo da Anemia das Células Falciformes

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Laura Margarida Soares de Aguiar

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Ângela Inácio, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa
Professora Doutora Deodália Dias, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Fatores Genéticos e Bioquímicos Moduladores do Fenótipo da Anemia das Células Falciformes

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Laura Margarida Soares de Aguiar

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Ângela Inácio, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa
Professora Doutora Deodália Dias, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Este trabalho foi realizado: no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, no Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, Lisboa e no Instituto De Investigação Científica Bento Da Rocha Cabral, Lisboa

Projeto parcialmente financiado pelo Instituto De Investigação Científica Bento Da Rocha Cabral, Lisboa

As referências bibliográficas nesta dissertação estão de acordo com as normas da revista
British Journal of Haematology

Agradecimentos

Ao longo deste trabalho contei com o apoio de várias pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do mesmo. Desta forma, quero expressar-lhes os meus agradecimentos.

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora externa, a Professora Doutora Ângela Inácio, por me ter proporcionado a elaboração deste trabalho no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (FMUL). Quero também agradecer pela confiança ao aceitar orientar-me, pela sua disponibilidade em ajudar-me, pelo apoio e pelo incentivo manifestados na concretização do mesmo.

Agradeço à Doutora Paula Faustino, na qualidade de coorientadora, por me proporcionar todas as condições para a realização de parte deste trabalho em colaboração com o Grupo de Investigação em Hemoglobinopatias, metabolismo do ferro e patologias associadas, pertencente à Unidade de Investigação e Desenvolvimento do Departamento de Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Agradeço também toda a disponibilidade e todos os conhecimentos transmitidos de ordem teórica e prática.

Ao Professor Doutor Manuel Bicho, Diretor do Laboratório de Genética da FMUL, quero agradecer a oportunidade concedida e esclarecimentos dados ao longo da realização deste trabalho.

Quero também agradecer ao Doutor João Lavinha, responsável pela Unidade de Investigação e Desenvolvimento do Departamento de Genética do INSA, pela oportunidade de realização de uma parte deste trabalho neste Instituto.

À Professora Doutora Deodália Dias, por ter aceitado ser a minha orientadora na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e por toda a dedicação e disponibilidade que sempre demonstrou desde o início do mestrado. Agradeço ainda a oportunidade que tive em frequentar este mestrado, e de uma forma geral a todos os professores do mestrado por toda a dedicação e novos conhecimentos transmitidos.

Agradeço igualmente a todas as colaboradoras do laboratório de genética da FMUL, nomeadamente à Andreia Matos, por todo o tempo dedicado a ajudar-me tanto na parte teórica como na parte laboratorial deste trabalho e pelas informações transmitidas e paciência, à Técnica de laboratório Conceição Afonso e à Ângela Gil, pelo suporte técnico e por toda a ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho, à Doutora Joana Ferreira, pela disponibilidade demonstrada, e às minhas colegas de mestrado e laboratório, Ana Carolina Santos e Ana Marta Luís, por toda a ajuda prestada ao longo deste ano.

Quero agradecer também aos meus colegas do Grupo de Investigação em Hemoglobinopatias do INSA, Lúcia Gonçalves e Ricardo Faria, por me terem dado formação laboratorial no início do ano, à Sofia Vargas pela paciência e por todo o apoio laboratorial e teórico e à Susana David, José Ferrão e Cristina por toda a disponibilidade, boa disposição e entreaajuda.

Agradeço à Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA pelo suporte técnico prestado e aos investigadores que nos deram as formações iniciais no INSA.

Quero agradecer ao meu tio, Pedro Aguiar, pela preciosa ajuda na análise estatística.

Aos doentes, seus familiares e médicos que colaboraram no estudo o meu agradecimento. Sem eles este trabalho nunca poderia ter sido realizado.

À minha família, também quero expressar um agradecimento muito especial pelo incentivo e apoio incondicional ao longo deste ano e também pelo esforço e dedicação na minha educação.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos pela ajuda, motivação e amizade e pela boa disposição que partilharam sempre comigo, em particular à Susana pelo material de apoio disponibilizado e aos meus amigos e colegas de mestrado Tiago, Joana, Simone, Sara, Manuela, Cristina e Mariana.

Resumo

A anemia das células falciformes (ACF) é uma anemia hereditária autossômica recessiva caracterizada pela presença de hemoglobina S (HbS). Esta doença é causada por uma mutação no gene da beta-globina o que provoca uma substituição de um aminoácido na sexta posição da cadeia beta-globínica. A vaso-oclusão e a anemia hemolítica são as principais características desta doença, contudo os doentes com ACF apresentam uma variabilidade clínica e hematológica que não pode ser explicada apenas pela mutação no gene da beta-globina. Outros moduladores genéticos e efeitos ambientais são importantes no fenótipo desta doença. Terapias específicas são necessárias para as diferentes manifestações clínicas da anemia das células falciformes, tais como a hidroxiureia, profilaxia com penicilina e vacinação, administração de analgésicos e transfusões sanguíneas. Estas terapias têm vários riscos associados. Os indivíduos com ACF também apresentam uma deficiência em arginina que contribui para uma perda da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO - *Nitric Oxide*). A suplementação oral em citrulina aumenta os níveis de arginina mais eficientemente que a própria arginina, aumentando assim a produção de NO.

O principal objetivo deste trabalho foi estudar a associação entre parâmetros hematológicos ou bioquímicos e variantes em genes candidatos. Este estudo teve também como objetivo estudar os efeitos da suplementação oral de citrulina na ACF. O estudo foi realizado em 26 doentes em idade pediátrica. Os parâmetros analisados foram hemoglobina total, HbS, bilirrubina, lactato desidrogenase (LDH), *red cell distribution width* (RDW), reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, fosfatase ácida, mieloperoxidase, redutase da metahemoglobina e redutase transmembranar e a genética incluiu o gene *HBA*, o agrupamento génico *HBB* e os genes *BCL11A*, *eNOS*, *HMOX-1*, *MTHFR* e *MPO*.

Os resultados deste estudo mostram uma associação estatisticamente significativa entre alguns parâmetros estudados e variantes genéticas, nomeadamente: 1) níveis mais elevados nas concentrações da mieloperoxidase e o haplótipo Senegal, 2) níveis mais elevados da atividade da fosfatase ácida e a deleção alfa-talassémica -3.7, 3) níveis mais elevados de reticulócitos e o genótipo TT do rs2070744 no gene *eNOS*, 4) níveis mais elevados de LDH e o genótipo TT do rs2070744 no gene *eNOS*, 5) níveis mais elevados de reticulócitos e o genótipo GG do rs1799983 no gene *eNOS*, 6) níveis mais elevados de LDH e o genótipo GG do rs1799983 no gene *eNOS* e 7) níveis mais elevados de neutrófilos e o alelo 4a do VNTR do intrão 4 no gene *eNOS*. Existe ainda uma diferença significativa nas concentrações de MPO entre os doentes estudados e o grupo controlo. Relativamente aos efeitos da suplementação oral com citrulina nestes doentes, não foram encontradas diferenças estatisticamente

significativas nos parâmetros hematológicos ou bioquímicos estudados entre os meses da toma do suplemento. Contudo, foi relatada uma melhoria clínica nos doentes.

Os resultados deste estudo reforçam a importância do NO na ACF. Pode presumir-se que o NO e possivelmente os seus precursores, como a citrulina, possam ser utilizados como terapia nestes doentes. Contudo, os resultados deste estudo deverão ser confirmados num maior grupo de doentes.

Palavras-chave: Anemia das Células Falciformes, Moduladores do Fenótipo, Citrulina, NO

Abstract

Sickle cell anemia (SCA) is an autosomal recessive hereditary anemia characterized by the presence of hemoglobin S (HbS). This disease is caused by a single point mutation in the beta-globin gene with a corresponding amino acid substitution at the sixth position of the beta-globin chain. Vaso-occlusion and hemolytic anemia are the major features of this disease, however SCA patients present clinical and hematologic variability that cannot be only explained by the single mutation. Others genetic modifiers and environmental factors are important for the clinical phenotype. Specific therapies are used to improve clinical manifestations of sickle cell anemia, such as hydroxyurea, vaccination and penicillin prophylaxis, administration of painkillers and blood transfusions. However, these therapies present several risk factors. SCA patients present arginine deficiency that contributes to a lower nitric oxide (NO) bioactivity. Oral supplementation with citrulline increases arginine levels more efficiently than arginine itself and promotes nitric oxide production.

The main aim of this work was to determine the association between hematological or biochemical parameters and genetic variants from several candidate genes. It was also intended to study the effects of oral citrulline supplementation in SCA. The study was performed in 26 paediatric patients. The parameters were: total Hb, HbS, bilirubin, lactate dehydrogenase (LDH), red cell distribution width (RDW), reticulocyte count, leukocytes, neutrophils, acid phosphatase, myeloperoxidase, methemoglobin reductase e transmembrane reductase, and the genetics was: *HBA* gene, *HBB* cluster and the genes *BCL11A*, *eNOS*, *HMOX-1*, *MTHFR* and *MPO*.

Results of this study show a significant statistical association between some parameters and genetic variants: 1) higher levels of myeloperoxidase concentrations were associated with haplotype Senegal, 2) higher levels of acid phosphatase activity were associated with the 3.7-kb deletion at *HBA* gene, 3) higher levels of reticulocytes were associated with rs2070744_TT at *eNOS* gene, 4) higher levels of LDH were associated with rs2070744_TT at *eNOS* gene, 5) higher levels of reticulocytes were associated with rs1799983_GG genotype at *eNOS* gene, 6) higher levels of LDH were associated with rs1799983_GG genotype at *eNOS* gene and 7) higher levels of neutrophils were associated with the *eNOS4a* allele. There is also a significance difference in MPO concentrations between SCA patients and the control group. Regarding the oral citrulline supplementation in SCA patients, the results show no significant statistical difference between the hematological and biochemical parameters between months. However, citrulline supplementation was associated with symptomatic improvement in patients.

The results of this study reinforce the importance of NO bioactivity in SCA. We presume that NO, and possible its precursors such as citrulline, might be used as therapy to improve the quality of life of these patients. However, these results should be confirmed in a larger patient group.

Keywords: Sickel Cell Anemia, Phenotypic Modifiers, Citrulline, NO

Abreviaturas

A	Adenina
ACF	Anemia das Células Falciformes
ARG	Arginina
ARMS	<i>Amplification-refractory Mutation System</i>
ASL	Argininosuccinato Liase
ASS	Argininosuccinato Sintase
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BCL11A	<i>B-cell lymphoma/leukemia</i>
C	Citosina
CHGM	Concentração da Hemoglobina Globular Média
CIT	Citrulina
CO ₂	Dióxido de Carbono
DCF	Doença das Células Falciformes
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleósidos trifosfatados
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
FA	Fosfatase Ácida
FAM	6-carboxifluoresceína
G	Guanina
gl	Grau de Liberdade
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>
Hb	Hemoglobina
HGM	Hemoglobina Globular Média
HMIP	<i>HBS1L MYB Intergenic Polymorphisms</i>
HMOX-1	Gene de codifica para a hemoxigenase
HO	Hemoxigenase
Hp	Haptoglobina
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HS	<i>Hypersensitive Site</i>
HU	Hidroxiureia
kb	Kilobase
L	<i>Long</i>
LCR	<i>Locus Control Region</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
M	<i>Medium</i>
MCS	<i>Multispecies Conserved Sequences</i>
MetaHb	Metahemoglobina
MPO	Mieloperoxidase
MTHFR	<i>Methylenetetrahydrofolate Reductase</i>
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NO	<i>Nitric Oxide</i>

NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
O ₂	Oxigênio
OR	<i>Odds Ratio</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHHF	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
pNP	p-nitrofenolato
pNPP	p-nitrofenilfosfato
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
RDW	<i>Red Cell Volume Distribution Width</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RMTHb	Redutase da Metahemoglobina
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotações por Minuto
RTM	Redutase Transmembranar
S	<i>Short</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STA	Síndrome Torácica Aguda
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
T	Timina
VGM	Volume Globular Médio
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>
χ^2	Qui-quadrado

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Abreviaturas	vi
Índice Geral	viii
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Hemoglobina	1
1.1.1. Organização e estrutura dos genes globínicos humanos	1
1.1.2. Expressão diferencial dos genes globínicos ao longo do desenvolvimento	3
1.2. Anemia das células falciformes	5
1.2.1. Epidemiologia	6
1.2.2. Fisiopatologia e manifestações clínicas	7
1.2.3. Diagnóstico	10
1.2.4. Fatores moduladores da anemia das células falciformes	11
1.2.4.1. α -talassémia	11
1.2.4.2. Hemoglobina fetal	12
1.2.4.2.1. Haplótipos no agrupamento beta-globínico	13
1.2.4.2.2. BCL11A	14
1.2.4.3. Sintase do óxido nítrico endotelial	15
1.2.4.4. Hemoxigenase 1	16
1.2.4.5. Redutase do metilenotetrahidrofolato	17
1.2.4.6. Mieloperoxidase	17
1.2.4.7. Haptoglobina	18
1.2.4.8. Fosfatase ácida do eritrócito	19
1.2.4.9. Redutase da metahemoglobina	19
1.2.4.10. Redutase transmembranar	20
1.2.5. Terapias no tratamento da anemia das células falciformes	21
1.2.5.1. Citrulina	22
2. Objetivos	25
3. Metodologia	26
3.1. Amostra	26
3.1.1. Amostra populacional	26
3.1.2. Amostra biológica	26

3.2.	Métodos	26
3.2.1.	Determinações genéticas.....	26
3.2.1.1.	Extração e quantificação de DNA.....	26
3.3.1.2.	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>), Gap-PCR e PCR alelo-específico	27
3.3.1.3.	Ensaio de restrição	28
3.3.1.4.	GeneScan	28
3.3.2.	Determinações bioquímicas	29
3.3.2.1.	Determinação da concentração da mieloperoxidase	29
3.3.2.2.	Determinação dos genótipos/fenótipos da haptoglobina	29
3.3.2.3.	Determinação da atividade da fosfatase ácida	29
3.3.2.4.	Determinação da atividade da redutase da metahemoglobina.....	30
3.3.2.5.	Determinação da atividade da redutase transmembranar.....	30
3.3.3.	Tratamento estatístico.....	30
4.	Resultados	31
4.1.	Caracterização da população em estudo.....	31
4.2.	Determinações genéticas	32
4.2.1.	Pesquisa da mutação drepanocítica	32
4.2.2.	Caracterização do haplótipo no agrupamento gênico da β -globina e associação com os parâmetros estudados	33
4.2.3.	Pesquisa da deleção α -Talassemica – $\alpha 3,7$ e associação com os parâmetros estudados	37
4.2.4.	Caracterização do polimorfismo em <i>BCL11A</i> e associação com os parâmetros estudados	39
4.2.5.	Caracterização dos polimorfismos em <i>eNOS</i> e associação com os parâmetros estudados	41
4.2.6.	Caracterização de polimorfismos em <i>HMOX-1</i> e associação com os parâmetros estudados	47
4.2.7.	Caracterização do polimorfismo do gene <i>MTHFR</i> e associação com os parâmetros estudados	51
4.2.8.	Caracterização do polimorfismo do gene <i>MPO</i> e associação com os parâmetros estudados....	53
4.3.	Determinações bioquímicas	55
4.3.1.	Determinação da concentração da mieloperoxidase	55
4.3.2.	Caracterização dos fenótipos da haptoglobina.....	56
4.3.3.	Determinação da atividade da fosfatase ácida	56
4.3.4.	Determinação da atividade da redutase da metahemoglobina	57
4.3.5.	Determinação da atividade da redutase transmembranar	57
4.4.	Avaliação da resposta à terapêutica da suplementação com citrulina	58
5.	Discussão	60
5.1.	Determinações genéticas e associação com os parâmetros estudados.....	60
5.2.	Determinações bioquímicas	64
5.3.	Avaliação da resposta à terapêutica da suplementação com citrulina	65
6.	Conclusões.....	67

7. Bibliografia	69
8. Anexos	77
Anexo I - Consentimento informado	77
Anexo II - Procedimento experimental para o tratamento das amostras para as determinações bioquímicas	78
Anexo III - Extração de DNA pelo método de <i>salting-out</i>	79
Anexo IV - Tampões para PCR e para eletroforese em gel de agarose	81
Anexo V - PCR: oligonucleótidos iniciadores, condições e tamanho dos fragmentos	82
Anexo VI - Gap-PCR: pesquisa da deleção alfa-talassêmica	85
Anexo VII - PCR alelo-específico: oligonucleótidos iniciadores, condições e tamanho dos fragmentos	86
Anexo VIII - Ensaio de restrição: condições, tamanho de fragmentos obtidos e determinação do haplótipo	87
Anexo IX - Determinação dos genótipos/fenótipos da haptoglobina	89
Anexo X - Atividade da fosfatase ácida	90
Anexo XI - Atividade da redutase da metahemoglobina	91
Anexo XII - Atividade da redutase transmembranar	92
Anexo XIII – Estatística descritiva dos parâmetros estudados (meses 0, 1, 3 e 6) e teste de normalidade	94
Anexo XIV - Correlações entre os parâmetros estudados normalizados e o tempo da toma do suplemento citrulina	95

Índice de Figuras

Figura 1-1 - Estrutura quaternária da molécula de hemoglobina	1
Figura 1-2 - Representação esquemática dos agrupamentos génicos globínicos α (a) e β (b)	2
Figura 1-3 - Representação esquemática da síntese das cadeias de globina durante o desenvolvimento	4
Figura 1-4 - Esfregaço de sangue periférico de um doente com anemia das células falciformes	6
Figura 1-5 - Fisiopatologia da anemia das células falciformes	8
Figura 1-6 - Estrutura química do aminoácido citrulina	22
Figura 4-1 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região genómica contendo a mutação drepanocítica e b) dos fragmentos obtidos por restrição informativa acerca da presença da mutação drepanocítica	33
Figura 4-2 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene γ -globina contendo o SNP rs7482144 e b) dos fragmentos obtidos por restrição informativa para determinação do haplótipo - restrição XmnI	34
Figura 4-3 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene γ -globina contendo o SNP rs2070972 e b) dos fragmentos obtidos por restrição informativa para determinação do haplótipo - restrição HindIII	34
Figura 4-4 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da extremidade 3' do $\psi\beta$ contendo o SNP rs968857 e b) dos fragmentos obtidos por restrição informativa para determinação do haplótipo - restrição HincII	35
Figura 4-5 - Gel de agarose com perfil eletroforético representativo de um Gap-PCR usado para detetar a deleção de 3,7 kb	37
Figura 4-6 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene <i>BCL11A</i> contendo o SNP rs11886868 e b) dos fragmentos obtidos por restrição com a enzima MboI	39
Figura 4-7 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene <i>eNOS</i> contendo o SNP rs2070744 e b) dos fragmentos obtidos por restrição com a enzima NaeI	41
Figura 4-8 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene <i>eNOS</i> contendo o SNP rs1799983 e b) dos fragmentos obtidos por restrição com a enzima MboI	43
Figura 4-9 - Gel de agarose com perfil eletroforético representativo de uma amplificação região genómica contendo o VNTR do intrão 4 do gene <i>eNOS</i>	45
Figura 4-10 - Gel de agarose com perfil eletroforético representativo de um PCR alelo-específico usado para detetar rs2071746 amplificado no gene <i>HMOX-1</i>	47
Figura 4-11- Imagem representativa de eletroferogramas obtidos por GeneScan mostrando fragmentos do STR rs3074372 no gene <i>HMOX-1</i> , representativos dos três tipos de classes de alelos: S, M e L	49
Figura 4-12 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene <i>MTHFR</i> contendo o SNP rs1801133 e b) dos fragmentos obtidos por restrição com a enzima HinfI	51
Figura 4-13 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene <i>MPO</i> contendo o SNP rs2333227 e b) dos fragmentos obtidos por restrição com a enzima AclI	53
Figura VI-1 - Genes da $\alpha 2$ - e $\alpha 1$ -globina	85
Figura VIII-1 - Esquema representativo do agrupamento génico da β -globina, localização dos RFLPs para a construção do haplótipo e classificação dos haplótipos	88
Figura IX-1- Imagem exemplificativa dos principais fenótipos da haptoglobina (Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2) em gel de poliacrilamida	89

Figura XIV-1 - Correlação entre os níveis de hemoglobina normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina	95
Figura XIV-2 - Correlação entre os níveis de HbS normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina	95
Figura XIV-3 - Correlação entre os níveis de bilirrubina normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina	96
Figura XIV-4 - Correlação entre os níveis de LDH normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina	96
Figura XIV-5 - Correlação entre os níveis de RDW normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina	97
Figura XIV-6 - Correlação entre os níveis de reticulócitos normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina	97
Figura XIV-7 - Correlação entre os níveis de leucócitos normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina	98
Figura XIV-8 - Correlação entre os níveis de neutrófilos normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina	98
Figura XIV-9 - Correlação entre os níveis de FA normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina	99
Figura XIV-10 - Correlação entre os níveis de MPO normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina	99
Figura XIV-11 - Correlação entre os níveis de RMHb normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina	100

Índice de Tabelas

Tabela 4-1 - Estatística descritiva dos parâmetros hemoglobina, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM e teste de normalidade Shapiro-Wilk.....	32
Tabela 4-2 - Associação entre os parâmetros estudados a presença ou ausência do haplótipo Senegal	36
Tabela 4-3 - Associação entre os parâmetros estudados e a ausência ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) ou presença em heterozigotia da deleção α -talassêmica $-\alpha3,7$ ($\alpha\alpha/-\alpha3,7$)	38
Tabela 4-4 - Associação entre os parâmetros estudados e os genótipos (TT e CT ou CC) do SNP rs1188686 no gene <i>BCL11A</i>	40
Tabela 4-5 - Associação entre os parâmetros estudados e os genótipos (TT e CT) do SNP rs2070744 no gene <i>eNOS</i>	42
Tabela 4-6 - Associação entre os parâmetros estudados e os genótipos (GG e GT ou TT) do SNP rs1799983 no gene <i>eNOS</i>	44
Tabela 4-7 - Associação entre os parâmetros estudados e a presença ou ausência do alelo 4a do VNTR do intrão 4 no gene <i>eNOS</i>	46
Tabela 4-8 - Associação entre os parâmetros estudados e os genótipos (AA, AT e TT) do SNP rs2071746 no gene <i>HMOX-1</i>	48
Tabela 4-9 - Associação entre os parâmetros estudados e a presença ou ausência do alelo L do STR rs3074372 no gene <i>HMOX-1</i>	50
Tabela 4-10 - Associação entre os parâmetros estudados e os genótipos (CC e CT ou TT) do SNP rs1801133 no gene <i>MTHFR</i>	52
Tabela 4-11 - Associação entre os parâmetros estudados e os genótipos (GG e AG ou AA) do SNP rs2333227 no gene <i>MPO</i>	54
Tabela 4-12 - Estatística descritiva dos FA, MPO, RMHb e RTM na população de doentes e nas populações controlo e teste de normalidade Shapiro-Wilk	55
Tabela 4-13 - Concentração da MPO para a população de doentes com anemia das células falciformes e o grupo controlo.....	56
Tabela 4-14 - Atividade da FA para a população de doentes com anemia das células falciformes e o grupo controlo	56
Tabela 4-15 - Atividade da RMHb para a população de doentes com anemia das células falciformes e o grupo controlo.....	57
Tabela 4-16 - Atividade da RTM para a população de doentes com anemia das células falciformes e o grupo controlo.....	57
Tabela 4-17 - Avaliação do tratamento com citrulina ao longo dos meses, nos parâmetros estudados	59
Tabela V-1 - Composição da mistura reacional para pesquisa da mutação drepanocítica, condições de PCR, composição dos oligonucleótidos iniciadores e tamanho dos fragmentos	82
Tabela V-2 - Composição da mistura reacional para os SNPs rs7482144, rs2070972 e rs968857 para construção do haplótipo do agrupamento génico da β -globina, condições de PCR, composição dos oligonucleótidos iniciadores e fragmentos obtidos.....	82
Tabela V-3 - Composição da mistura reacional para os SNPs rs11886868 do gene <i>BCL11A</i> , rs2070744 e rs1799983 do gene <i>eNOS</i> , rs2333227 do gene <i>MPO</i> e rs1801133 do gene <i>MTHFR</i> , condições de PCR, composição dos oligonucleótidos iniciadores e fragmentos obtidos	83

Tabela V-4 - Composição da mistura reacional, condições de PCR, composição dos oligonucleótidos iniciadores e fragmentos obtidos para o VNTR no intrão 4 de <i>eNOS</i>	84
Tabela VI-1 - Composição da mistura reacional utilizada para a detecção da deleção $-\alpha 3,7$ e as respectivas condições de Gap-PCR, composição dos oligonucleótidos iniciadores e fragmentos obtidos	85
Tabela VII-1 - Composição da mistura reacional, condições de PCR-alelo específico, composição dos oligonucleótidos iniciadores e fragmentos obtidos para o SNP rs2071746 em <i>HMOX-1</i> e para o GeneScan posterior que permite determinar o número de repetições GT presentes nos mesmos fragmentos.....	86
Tabela VIII-1 - Condições das reações de restrição para a confirmação da mutação drepanocítica e tamanho de fragmentos obtidos.....	87
Tabela VIII-2- Condições das reações de restrição para os SNPs rs7482144, rs2070972e rs968857 para construção do haplótipo do agrupamento génico da β -globina e tamanho de fragmentos obtidos.....	87
Tabela VIII-3 - Condições das reações de restrição para os rs11886868 do gene <i>BCL11A</i> , rs2070744 e rs1799983 do gene <i>eNOS</i> , rs2333227 do gene <i>MPO</i> e rs1801133 do gene <i>MTHFR</i> e tamanho dos fragmentos obtidos	88
Tabela XIII-1 - Estatística descritiva dos parâmetros hemoglobina, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM ao longo dos meses de toma de citrulina e teste de normalidade Shapiro-Wilk.....	94

1. Introdução

1.1. Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) (Figura 1-1) é uma metaloproteína tetramérica presente no interior dos eritrócitos, cuja principal função é o transporte do oxigênio (O₂) para os tecidos. Esta metaloproteína é composta por dois pares de cadeias polipeptídicas, as globinas, cada uma das quais está ligada a um grupo heme que contem ferro (Bain, 2006). O grupo heme é essencial para o transporte de oxigênio, enquanto a globina serve para proteger o grupo heme da oxidação, permitindo a variação da afinidade ao oxigênio (Helms & Kim-shapiro, 2013). Existem vários tipos de hemoglobinas que diferem entre si na composição das cadeias globínicas. As globinas são codificadas, no Homem, por dois agrupamentos génicos nos cromossomas 11 e 16, sendo que estes genes estão dispostos de um modo sequencial no sentido 5'→3' de acordo com a ordem de ativação e expressão durante a ontogénese. Todos os genes globínicos partilham estrutura semelhante, sendo constituídos por três regiões codificantes (exões) intercaladas por duas regiões não codificantes (intrões) (Grosso *et al*, 2012).

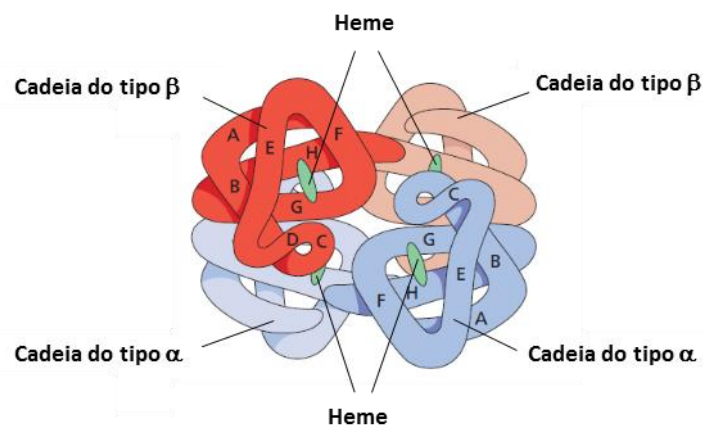


Figura 1-1 - Estrutura quaternária da molécula de hemoglobina. A hemoglobina é uma metaloproteína tetramérica composta por duas cadeias do tipo α e duas cadeias do tipo β . Cada cadeia possui um polipéptido e um grupo heme. As letras maiúsculas (A a H) indicam homólogos das hélices α (Adaptado de Bain, 2006).

1.1.1. Organização e estrutura dos genes globínicos humanos

O agrupamento α -globínico (Figura 1-2a) localiza-se próximo do telómero do cromossoma 16 (16p13.3), ocupando uma região de cerca de 28 kb. É composto, no sentido 5'→3', pelo gene zeta (ζ), pelo pseudogene zeta ($\psi\zeta$), por dois pseudogenes alfa ($\psi\alpha 2$ e $\psi\alpha 1$), por dois genes alfa ($\alpha 2$ e $\alpha 1$) e

pelo gene teta (θ), de função desconhecida (Bain, 2006). A expressão destes genes é regulada por uma região em *cis*, a montante deste agrupamento génico. Esta região genómica é constituída por quatro sequências conservadas entre espécies (MCS- *Multispecies Conserved Sequences*) associadas a locais hipersensíveis à ação da enzima DNaseI (HS-*Hypersensitive Site*), específicos de tecido eritroide, designados no Homem por HS-48, HS-40, HS-33 e HS-10, consoante a sua distância em kb relativamente ao gene da ζ -globina. Destes quatro locais, salienta-se o HS-40 que é o principal elemento regulador da expressão génica deste agrupamento. Nos seres humanos, deleções no HS-40 dão origem a severas reduções da expressão de α -globina (Voon & Vadolas, 2008).

O agrupamento β -globínico (Figura 1-2b) encontra-se no cromossoma 11 (11p15.5) e engloba cerca de 100 kb. É composto, no sentido 5' \rightarrow 3', pelo gene ϵ , por dois genes γ (γ^G e γ^A), pelo pseudogene $\psi\beta$ e pelos genes δ e β (Bain, 2006). Os pseudogenes presentes tanto neste agrupamento como no agrupamento α -globínico são homólogos não funcionais dos genes globínicos, sendo estes transcritos mas não traduzidos não sendo, portanto, expressos (Bain, 2006). O agrupamento da β -globina contém, também, 6 a 25 kb a montante dos respetivos genes, uma região de controlo do *locus* (LCR- *Locus Control Region*) com 5 sítios hipersensíveis à DNaseI (HS-1 a HS-4 específicos de eritrócitos e HS-5 ubíquo). Estes sítios correspondem a regiões cuja estrutura da cromatina permite interações com fatores de transcrição, assumindo uma importância crucial na regulação da expressão dos genes deste agrupamento (Fu *et al*, 2002). Nos seres humanos, deleções no LCR, dão origem a β -talassémia com completa ausência da expressão dos genes β (Stamatoyannopoulos, 2005).

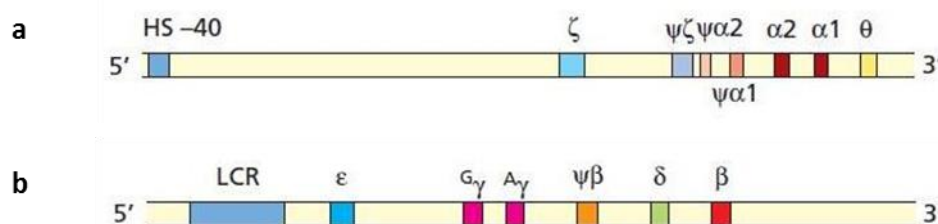


Figura 1-2 - Representação esquemática dos agrupamentos génicos globínicos α (a) e β (b). a) O agrupamento α -globínico é composto pelo gene ζ , pelo pseudogene $\psi\zeta$, por dois pseudogenes alfa ($\psi\alpha2$ e $\psi\alpha1$), por dois genes alfa ($\alpha2$ e $\alpha1$) e pelo gene θ e ainda contém, a montante dos genes, locais hipersensíveis à ação da enzima DNaseI (locais HS), destacando-se HS-40. b) O agrupamento β -globínico é composto pelo gene ϵ , por dois genes γ (γ^G e γ^A), pelo pseudogene ($\psi\beta$) e pelos genes δ e β . Este agrupamento ainda contém, a montante dos respetivos genes, uma região de controlo do *locus* (LCR- *Locus Control Region*) (Adaptado de Bain, 2006).

1.1.2. Expressão diferencial dos genes globínicos ao longo do desenvolvimento

Durante a ontogénese a expressão dos genes globínicos é rigorosamente coordenada, dando origem a diferentes tipos de hemoglobinas nos vários estádios do desenvolvimento, segundo as cadeias que estão a ser expressas em cada agrupamento génico. Como tal, cada agrupamento de genes globínicos está sujeito à ocorrência de eventos comutativos (*switching*), durante os quais a expressão génica de alguns genes é silenciada e a de outros ativada. Estes eventos representam um dos mais intrigantes e estudados mecanismos de regulação da expressão génica que leva a alterações progressivas e sequenciais na expressão de genes globínicos embrionários, fetais e adultos, permitindo assim, sintetizar diferentes tipos de tetrâmeros de hemoglobina (Stamatoyannopoulos, 2005; Grosso *et al*, 2012).

A síntese de Hb humana envolve dois eventos comutativos, um deles por volta da sexta semana de gestação (comutação embrionária) e o outro ao nascimento (comutação fetal) (Figura 1-3). Os primeiros genes a serem expressos são os genes ζ -globina (tipo α) e ε -globina (tipo β) sintetizados no saco vitelino, dando origem a Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$). Em seguida, o fígado torna-se então o local predominante da eritropoiese, a síntese de cadeias α e γ é ativada, originando-se a Hb embrionária Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) e a Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$). A expressão dos genes ζ -globina e ε -globina é silenciada e as hemoglobinas embrionárias são progressivamente e completamente substituídas pela Hemoglobina fetal, Hb F ($\alpha_2\gamma_2$). Após o nascimento, a HbF tem um declínio gradual, até que na fase adulta apenas representa menos de 1% da Hb total do sangue. É também após o nascimento que se dá o segundo evento de comutação, com a ativação do gene da β -globina nas células eritroides da medula óssea. O gene δ -globina mantém a sua expressão a partir do nascimento. Concomitantemente, ocorre o silenciamento dos genes fetais γ -globínicos. A expressão destes genes vai manter-se estável ao longo da vida adulta e as suas cadeias globínicas respetivas, vão associar-se com duas cadeias α -globina originando a HbA ($\alpha_2\beta_2$), que representa cerca de 97% da hemoglobina total de um adulto, e a HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) que é aproximadamente 2-3% do total de hemoglobina (Grosso *et al*, 2012).

A transcrição de genes globínicos humanos é regulada ao longo da ontogenia por mecanismos complexos (Stamatoyannopoulos, 2005). O controlo transcricional da expressão de cada gene globínico requer regiões regulatórias a montante distais, bem como regiões proximais ao promotor. Os promotores de todos os genes globínicos partilham uma elevada homologia mas também têm sequências únicas que são responsáveis pela regulação específica ao longo dos estádios específicos do desenvolvimento. Todas as regiões promotoras também contêm sítios de ligação para fatores

transcricionais específicos. Todos estes elementos, através de interações diretas com o LCR e fatores de transcrição, atuam como reguladores positivos que são necessários para uma transcrição adequada. Vários outros elementos regulatórios positivos conhecidos como *enhancers* foram identificados dentro da sequência génica ou em regiões intergênicas que aumentam a atividade transcricional de certos promotores. Elementos silenciadores que atuam como repressores da expressão génica desempenham um papel no controlo do desenvolvimento da expressão dos genes globínicos, na comutação da produção de hemoglobina de embrionária para fetal e de fetal para adulta. Estes elementos encontram-se na região promotora distal do gene da ϵ -globina e dos genes da γ -globina. O principal papel do LCR no agrupamento β -globínico é conferir um estado específico de cromatina aberta no *loci* do gene e também permitir a interação de fatores transcricionais com promotores específicos dos genes globínicos, de forma específica ao longo do desenvolvimento. Assim, a expressão dos genes globínicos específicos dos diferentes estadios pode depender da localização dos genes no agrupamento bem como da disponibilidade de fatores de transcrição específicos do estadio (Grosso *et al*, 2012).

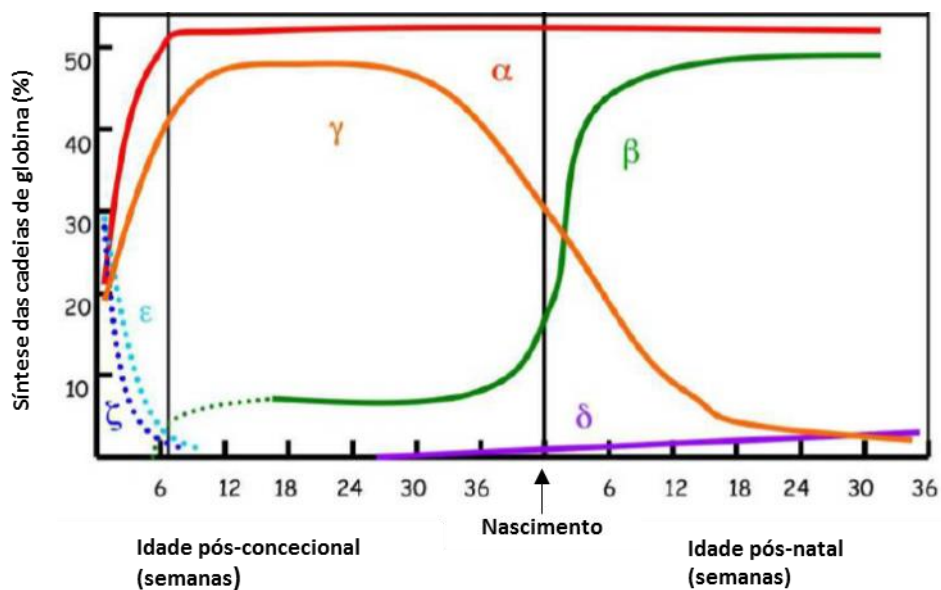


Figura 1-3 - Representação esquemática da síntese das cadeias de globina durante o desenvolvimento. O eixo das abcissas representa a idade, em semanas, após a concepção e após o nascimento. O eixo das ordenadas corresponde à percentagem da síntese das cadeias de globina. Os genes embrionários são expressos durante as seis primeiras semanas de gestação. A primeira comutação ocorre por volta da sexta semana de gestação (1ª linha vertical) e a segunda logo após o nascimento. O nascimento é representado pela 2ª linha vertical (Adaptado de Grosso *et al*, 2012).

1.2. Anemia das células falciformes

As hemoglobinopatias são doenças monogénicas hereditárias autossómicas recessivas associadas à síntese de hemoglobina e podem ser classificadas como quantitativas, quando há redução ou ausência da síntese das cadeias globínicas (talassémias), ou como qualitativas, quando é sintetizada uma cadeia globínica estruturalmente diferente (variantes de hemoglobina) (Bain, 2006). Estas doenças são comuns em populações de regiões onde a malária era endémica como é o caso de África, bacia do mediterrâneo, o Médio Oriente, o subcontinente Indiano, o sudeste Asiático e o sul da China (Miranda *et al*, 2013). A β -talassémia e a doença das células falciformes (DCF), causadas por lesões que afetam o gene da β -globina, são as doenças genéticas mais comuns no mundo, constituindo um grave problema de saúde pública (Thein & Menzel, 2009).

A doença das células falciformes é uma doença que se caracteriza pela síntese de variantes estruturais de hemoglobina causando uma malformação e hemólise de glóbulos vermelhos. O primeiro relato desta doença foi feito em 1910 por James B. Herrick, em que publicou um caso de um paciente que tinha “glóbulos vermelhos alongados e peculiares em forma de foice” (Stanley & Christian, 2013). Estas células têm o nome de eritrócitos falciformes ou drepanócitos e são características desta doença (Figura 1-4). O termo doença das células falciformes é utilizado para se referir a todos os genótipos diferentes que causam características clínicas da síndrome, enquanto a anemia das células falciformes (ACF), a forma mais comum da DCF, se refere especificamente à homozigotia do alelo β^s (HbS). Outras formas da doença incluem indivíduos duplos heterozigóticos com uma mutação diferente no segundo alelo β (β^0 -talassémia, β^+ -talassémia ou variante C de hemoglobina - HbC) (Rees *et al*, 2010). Os indivíduos heterozigóticos ou portadores para a variante S de hemoglobina (HbAS) são clinicamente benignos na maioria das situações (Wood, 1999).

A anemia das células falciformes é uma anemia hemolítica hereditária que se caracteriza pela predominância de uma variante da hemoglobina, a Hemoglobina S (HbS), que resulta da presença em homozigotia da mutação GAG>GTG, que é devida à substituição de um único nucleótido, no codão 6 do gene da β -globina (HBB:c.20A>T), o que provoca a substituição de um resíduo de ácido glutâmico por valina no sexto aminoácido da cadeia β -globínica. Os indivíduos homozigóticos para HbS não sintetizam cadeias β -globina normais, apresentando completa ausência de HbA, apresentam como maior componente a HbS, que representa uma percentagem de hemoglobina total superior a 85%, uma percentagem normal de HbA₂ e uma proporção bastante variável de HbF (Schnog *et al*, 2004).

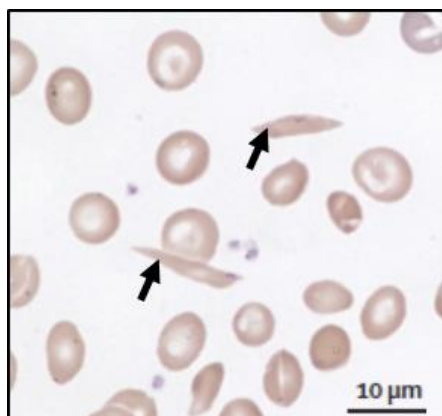


Figura 1-4 - Esfregaço de sangue periférico de um doente com anemia das células falciformes. As setas apontam para dois eritrócitos falciformes (Adaptado de Rees *et al*, 2010).

1.2.1. Epidemiologia

A distribuição global de HbS deve-se à seleção positiva dos indivíduos heterozigóticos face à malária e migração subsequente. Foram descritos cinco haplótipos principais associados à mutação drepanocítica, nomeados de acordo com a região em que ocorreu a mutação (Benim, Bantu, Camarões, Senegal e Asiático), apoiando a hipótese de que a mutação drepanocítica ocorreu pelo menos quatro vezes em África e uma vez na Índia (Schnog *et al*, 2004).

A prevalência de indivíduos afetados pela DCF é muito comum na África subsariana, estando estimado que surjam todos os anos cerca de 230 000 novos casos nesta região (0,74% dos nascimentos na África subsaariana). Por comparação, a estimativa anual de nascimentos com DCF reflete-se em 2 600 casos na América do Norte e 1 300 na Europa (Rees *et al*, 2010).

Em Portugal estima-se que a prevalência média de portadores de HbS é de 0,32%, atingindo valores mais elevados no distrito de Beja (1,11%) explicada pelo histórico de ocupação desta região por árabes e escravos africanos. Existem ainda bolsas de prevalência superiores a 5% em Coruche, Alcácer do Sal e Pias, regiões onde a malária foi endémica (Martins *et al*, 1993; Miranda *et al*, 2013). Hoje em dia ainda existe uma importação que resulta da contribuição da imigração recente proveniente de antigas colónias de África (Lavinha *et al*, 1992). Na população portuguesa os haplótipos mais frequentes são o Bantu e o Senegal, sendo mais raro o Benim, concentrando-se os primeiros nos locais onde a partir do século XV houve comércio de escravos enquanto o Benim está espalhado pelo sul do país. Isto significa que no que diz respeito à HbS, Portugal comporta-se como um país africano (Lamy *et al*, 1995).

1.2.2. Fisiopatologia e manifestações clínicas

A fisiopatologia da ACF (Figura 1-5) resulta direta ou indiretamente da presença de células falciformes (Wood, 1999). A substituição de timina (T) por adenina (A) no codão 6 do gene da β -globina provoca a substituição de um resíduo de ácido por um de valina, atribuindo-lhe uma nova propriedade de polimerização induzida por desoxigenação. A HbS desoxigenada interage de forma hidrofóbica com as cadeias adjacentes (ligação entre as cadeias $\beta 1$ e $\beta 2$ de duas moléculas de hemoglobina) e à medida que polimeriza e as fibras alinham, dá-se uma distorção do eritrócito e uma diminuição da sua flexibilidade. Os eritrócitos falciformes, devido à sua forma irregular, apresentam uma propensão aumentada para aderir às paredes dos vasos sanguíneos causando vaso-oclusão. Os eritrócitos falciformes são também extremamente suscetíveis à hemólise, o que desencadeia uma anemia hemolítica crónica (Rees *et al*, 2010).

Um papel importante da hemólise na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO-*nitric oxide*) tem sido estabelecido. A Hemoglobina livre no plasma vai gerar espécies reativas de oxigénio (ROS-*reactive oxygen species*) que são potentes captadores de NO. A hemólise também liberta arginase eritrocitária no plasma. A arginase metaboliza arginina (ARG) no plasma em ornitina, diminuindo o substrato necessário para a síntese de NO e leva à diminuição da biodisponibilidade do NO em doentes com ACF (Rees *et al*, 2010).

O principal determinante para a severidade da doença é a extensão e taxa de polimerização de HbS (Rees *et al*, 2010). Vários fatores interferem com a sua polimerização. Decréscimos no pH (que reduzem a afinidade da hemoglobina para o oxigénio) aumentam a polimerização de HbS, assim como um aumento da temperatura. A concentração de HbS nos eritrócitos tem uma grande importância, com maiores concentrações de HbS levando a uma maior taxa de polimerização (Schnog *et al*, 2004). Outro determinante para a polimerização é a presença de outras hemoglobinas, como HbF e HbA2 (Schnog *et al*, 2004), ou a co-herança de alfa-talasémia (Rees *et al*, 2010) que limitam a polimerização de HbS.

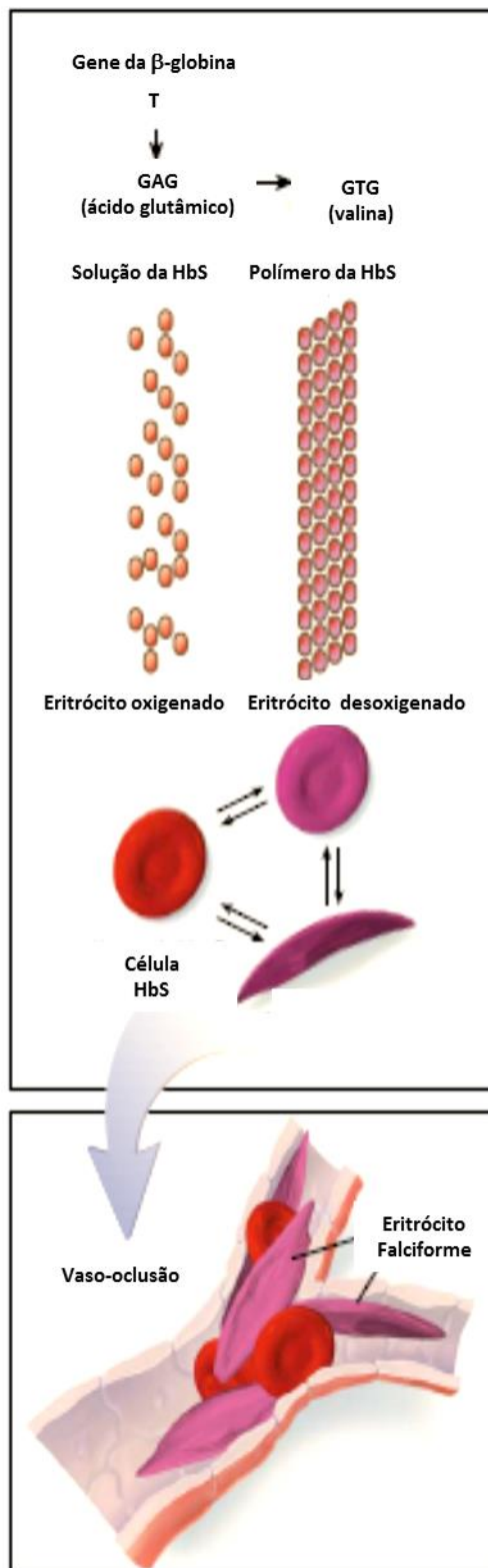


Figura 1-5 - Fisiopatologia da anemia das células falciformes. Na hemoglobina S (HbS), a substituição de timina (T) por adenina (A) no codão 6 do gene da β -globina, provoca a substituição de um resíduo de ácido por um de valina. Quando desoxigenada, HbS polimeriza, resultando na distorção do eritrócito e danos na membrana. Alguns eritrócitos falciformes aderem a células endoteliais, levando à vaso-oclusão (Adaptado de Wood, 1999).

A anemia das células falciformes é caracterizada por manifestações clínicas de gravidade variável que se devem essencialmente aos fenómenos de hemólise e vaso-oclusão (Schnog *et al*, 2004).

A anemia hemolítica ocorre em todas as formas significativas de DCF, mas é menos grave em doentes com co-herança de talassémia, HbSC ou elevado nível de HbF. A sobrevivência dos eritrócitos é estimada como sendo cerca de 17 dias em doentes com ACF, em contraste com 120 dias em pessoas saudáveis (Schnog *et al*, 2004). A hemólise intravascular na ACF resulta de alterações de membrana induzidas pela falciformação, desidratação celular e dano direto da membrana pelos polímeros rígidos de HbS. A destruição de monócitos e macrófagos de células na microcirculação também contribui para o encurtamento do tempo de vida dos eritrócitos (Schnog *et al*, 2004). No recém-nascido a doença é praticamente assintomática, uma vez que a hemoglobina é composta maioritariamente por HbF. Quando HbF começa a ser substituída por HbS, surge a sintomatologia. Embora exista uma grande variabilidade entre os doentes, o nível de hemoglobina permanece relativamente constante até à quarta década de vida. Depois disso, os níveis de hemoglobina caem, possivelmente como resultado do declínio da função renal e insuficiência da medula (Schnog *et al*, 2004). As consequências da anemia hemolítica na ACF são diversas. De forma a compensar a reduzida capacidade de transporte de oxigénio, os doentes com ACF têm uma circulação hiperdinâmica com um volume do plasma expandido e desenvolvem cardiomiopatia numa idade precoce. Como resultado da hemólise crónica há um aumento dos níveis de bilirrubina não conjugada, levando a icterícia e uma elevada incidência de cálculos biliares (Schnog *et al*, 2004). Hipertensão pulmonar, priapismo, úlceras de perna, colelitíase e possivelmente acidente vascular cerebral (AVC) são outros sub-fenótipos da doença que estão relacionadas com a intensidade de hemólise (Rees *et al*, 2010).

A vaso-oclusão é responsável pela maioria das complicações relacionadas com ACF. Os eventos de vaso-oclusão na microcirculação despoletam isquemia nos tecidos, que por sua vez originam dores fortes, crónicas ou agudas, potencialmente em qualquer órgão do corpo incluindo os ossos, os pulmões, o fígado, os rins, os olhos, o cérebro e as articulações. As causas mais frequentes de internamento de doentes com ACF são as crises dolorosas. Em crianças, as crises dolorosas estão frequentemente associadas com dactilites o que pode desencadear a falência de crescimento dos ossos dos dedos, apresentando-se estes deformados e encurtados. Uma outra causa frequente de hospitalização e uma das principais causas de morte é a síndrome torácica aguda (STA), que ocorre em 15-40% dos doentes com ACF. Fatores de risco para a STA são: STA prévio, elevada contagem de leucócitos e menor percentagem de HbF (Schnog *et al*, 2004). O AVC ocorre em até 11% dos doentes com ACF antes da terceira década de vida, e é uma das complicações mais devastadoras e uma das

principais causas de morte. Tanto o AVC isquêmico como o AVC hemorrágico ocorrem em todas as idades, embora o AVC isquêmico ocorra mais frequentemente em doentes mais jovens e o hemorrágico é mais frequente em doentes na terceira década de vida. Fatores de risco para AVC incluem baixos níveis de Hb, contagens elevadas de leucócitos, dactilite em crianças, hipoxemia noturna, baixos níveis de HbF e elevados níveis de homocisteína, assim como STA recentes ou frequentes e hipertensão sistólica. O comprometimento cognitivo tem sido associado a lesões cerebrais isquêmicas na ausência do AVC. Esta doença cerebral silenciosa pode ocorrer em até um terço dos doentes com DCF e também está associado com um aumento do risco para AVC. Outras complicações importantes da ACF são necrose avascular, alterações da função renal e da função esplênica. De facto, o baço é um dos primeiros órgãos a ser afetado na ACF. Na maioria das crianças com ACF, um período de hiperesplenismo é seguido pela atrofia do baço (Schnog *et al*, 2004). Este evento torna os doentes suscetíveis a infeções por microrganismos. As infeções bacterianas ainda são a principal causa de morbilidade e mortalidade em crianças com DCF (Rees *et al*, 2010).

1.2.3. Diagnóstico

O diagnóstico da ACF deve ser ponderado em doentes com anemia hemolítica ou qualquer uma das síndromes clínicas descritas acima. A anemia hemolítica, caracterizada por baixos níveis de hemoglobina (6 e 8 g/dL) e hematócrito, elevada contagem de reticulócitos, elevados níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH) e baixos níveis séricos de haptoglobina, está presente na grande maioria destes doentes (Roseff, 2009; Schnog *et al*, 2004). Outra consequência da elevada taxa de hemólise é a acumulação de bilirrubina não conjugada ou indireta (Roseff, 2009). O *red cell volume distribution width* (RDW) também se encontra elevado nestes doentes (Roberts & El Badawi, 1985). O volume globular médio (VGM) é normal a ligeiramente elevado. Os eritrócitos falciformes podem ser visualizados num esfregaço de rotina de sangue periférico. O teste de solubilidade da hemoglobina pode ser utilizado como um teste de rastreio rápido para a presença de HbS, mas não permite distinguir entre os diferentes genótipos. Eletroforese de hemoglobina, cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*) e focagem isoelétrica podem ser utilizadas para determinar a presença de variantes de Hb. A pesquisa da mutação drepanocítica por biologia molecular é realizada se houver necessidade de confirmar o resultado bioquímico ou em situações, por exemplo, de diagnóstico pré-natal (Schnog *et al*, 2004).

1.2.4. Fatores moduladores da anemia das células falciformes

Embora seja uma doença monogénica autossómica recessiva, a anemia das células falciformes caracteriza-se por uma grande variabilidade do seu fenótipo clínico. Esta variabilidade pode ser atribuída a fatores ambientais e fatores genéticos que poderão modular o fenótipo desta doença (Driss *et al*, 2009). Ao longo dos últimos anos vários estudos de associação genótipo-fenótipo foram realizados para identificar moduladores genéticos desta doença. Até ao momento considera-se que os principais moduladores desta doença são a co-herança de α -talassémia e a concentração de hemoglobina fetal (Steinberg & Sebastiani, 2012).

1.2.4.1. α -talassémia

A α -talassemia é causada pela produção reduzida ou ausente das cadeias de α -globina (*HBA*) (Galanello & Cao, 2011). Em mais de 30% de doentes de origem Africana com DCF existem traços de α -talassémia, sendo geralmente heterozigóticos ou homozigóticos para a deleção $-3,7$ kb (Steinberg & Sebastiani, 2012). Em algumas populações, como a Índia, está presente em mais de 50% dos doentes com DCF (Rees *et al*, 2010). A co-herança de α -talassémia na DCF modifica o seu fenótipo hematológico e clínico. A α -talassémia modula a ACF por diminuir a concentração de intracelular de HbS e consequentemente a sua polimerização, o que resulta numa diminuição das taxas de hemólise (Rees *et al*, 2010; Steinberg & Sebastiani, 2012). A α -talassémia também provoca uma redução do VGM, da hemoglobina globular média (HGM) e da concentração da hemoglobina globular média (CHGM) dos eritrócitos falciformes (Steinberg & Embury, 1986). Também se verifica um aumento no nível de HbA₂ e uma diminuição dos níveis de bilirrubina e da enzima LDH. Resulta ainda num prolongamento do tempo de vida do glóbulo vermelho devido à redução do número de células rígidas e densas, o que leva a um menor grau de hemólise, diminuição das contagens de reticulócitos e hematócrito mais elevado. Estas alterações dependem dos genes α -globínicos delecionados (Steinberg & Sebastiani, 2012).

Os efeitos clínicos da α -talassémia são variáveis e geralmente benéficos para o doente. A coexistência de α -talassémia está associada a menores complicações como acidentes vasculares cerebrais e úlceras das pernas (Taylor VI *et al*, 2008). Outros estudos realizados mostraram que outras manifestações da doença, priapismo (Nolan *et al*, 2005) e função esplénica (Wali *et al*, 2002), também parecem beneficiar da coexistência de α -talassémia. Por outro lado parece estar associada a aumento de outras complicações como os episódios de dor, síndrome torácica aguda e osteonecrose,

complicações associadas ao aumento da viscosidade sanguínea em doentes com ACF com α -talassémia (Steinberg & Sebastiani, 2012).

1.2.4.2. Hemoglobina fetal

A hemoglobina fetal é o modulador mais importante das características clínicas e hematológicas da ACF porque, exercendo a sua ação benéfica a nível celular, permite não só por diminuir a concentração da HbS mas também inibir a sua polimerização (Poillon *et al*, 1993).

Entre os doentes com anemia de células falciformes a concentração de HbF pode variar entre 0,1% e 30% com uma média de cerca de 8% (Steinberg, 2005). Os níveis de HbF aumentados conferem grandes benefícios clínicos e estão associados principalmente a uma taxa reduzida de episódios de dor agudos, menos úlceras de pernas, menos osteonecrose, síndrome torácica aguda menos frequente e maior longevidade (Akinsheye *et al*, 2011). Contudo o nível de HbF não tem sido associado à proteção para hipertensão pulmonar, AVC ou priapismo. Isto parece paradoxal uma vez que a expressão de HbF na ACF é conhecida como estando associada com uma diminuição da hemólise. A solução para este paradoxo parece estar na elevada taxa de hemólise na fração de eritrócitos que não expressam HbF (Schnog *et al*, 2004). Os resultados de um estudo realizado em doentes com ACF sugeriram que o limiar de HbF adequado para a prevenção de lesões nos órgãos era de 10% enquanto para a prevenção de eventos clínicos recorrentes era de 20% (Powars *et al*, 1984).

O grau da persistência de HbF varia grandemente entre indivíduos adultos e essa variabilidade é largamente controlada geneticamente. A persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) é um termo descritivo para uma gama de alterações geneticamente determinadas em que os níveis de HbF se mantêm elevados na vida adulta, na ausência de outras doenças hematológicas (Thein & Menzel, 2009). Quando estas alterações se devem a mutações pontuais nos promotores dos genes γ -globina ou a deleções no agrupamento β -globínico, chama-se PHHF pancelar. Estas formas mendelianas de PHHF são raras e não explicam a forma comum de persistência hereditária de hemoglobina fetal, a heterocelular que corresponde a um traço genético quantitativo (Thein & Menzel, 2009). Estudos genéticos identificaram três principais traços quantitativos (QTL-*Quantitative Trait Locus*), relativamente ao agrupamento β -globínico um em *cis*, o polimorfismo XmnI na região promotora dos genes γ globina, e dois em *trans*, o locus *BCL11A* (*B-cell lymphoma/leukemia 11A*) no cromossoma 2 e o locus *HMIP* (*HBS1L MYB Intergenic Polymorphisms*) no cromossoma 6 (Rees *et al*, 2010; Steinberg & Sebastiani, 2012).

1.2.4.2.1. Haplótipos no agrupamento beta-globínico

Como referido anteriormente, a mutação drepanocítica parece ter tido origem pelo menos cinco vezes. Foram descritos quatro haplótipos em África, conhecidos como Senegal, Benim, Bantu e Camarões e um na Arábia Saudita e Índia, o Arabo-indiano ou Asiático (Schnog *et al*, 2004).

Os níveis de HbF variam de acordo com o haplótipo e estão relacionados com diferentes severidades de manifestações clínicas. Níveis mais elevados de hemoglobina fetal estão associados com os haplótipos Senegal e Asiático, o que confere um fenótipo hematológico e clínico mais suave em comparação com os outros haplótipos africanos (Benim, Bantu e Camarões). Os indivíduos Benim normalmente têm características intermédias e os indivíduos com haplótipo Bantu têm níveis de HbF e hematócrito menores apresentando um fenótipo mais grave. Estas diferenças foram atribuídas à co-herança de polimorfismos ou variantes genéticas que afetam os motivos reguladores no interior ou na proximidade do gene da β -globina (*HBB*) (Driss *et al*, 2009; Thein & Menzel, 2009). O mais conhecido é um polimorfismo de um nucleótido (SNP- *Single Nucleotide Polymorphism*) (C/T) na posição -158 do promotor do *HBG2* (gene da γ -globina) que cria um sítio de restrição para a enzima XmnI (Gilman & Huisman, 1985; Thein & Menzel, 2009), o SNP XmnI-*HBG2* (rs7482144) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=7482144). O sítio XmnI-*HBG2* (variante T a -158 de *HBG2*) é a característica comum aos haplótipos Senegal e Asiático, estando assim associado a níveis mais elevados de HbF e células F (as quantidades residuais de HbF em adultos estão distribuídas de forma desigual entre os eritrócitos, sendo que aqueles que contêm quantidades mensuráveis são denominados células F) (Driss *et al*, 2009; Thein *et al*, 2009). A variante T a -158 de *HBG2* foi também associada a PHHF tipo Suíço (Efremov *et al*, 1987). A influência da variante T de *HBG2* poderá ser explicada pelo efeito direto na expressão génica de *HBG2*, suportada pelo relativo aumento de γ globina nos portadores, mas estudos funcionais *in vitro* têm sido inconclusivos (Thein *et al*, 2009).

Na população em geral o sítio XmnI-*HBG2* é comum encontrando-se presente em cerca de 30% da maioria dos grupos populacionais incluindo Europeus, Africanos e Asiáticos. Este sítio provoca um efeito mínimo nos níveis de HbF em indivíduos normais ou portadores de HbS, mas na presença de anemia pode desencadear um aumento da produção de HbF, a níveis que podem atenuar a gravidade clínica (Thein & Menzel, 2009).

Embora a presença em *cis* do sítio XmnI-*HBG2* seja um fator modulador dos níveis de HbF, dentro de cada haplótipo existe uma considerável heterogeneidade de HbF, sugerindo que elementos

genéticos em *trans* relativamente ao agrupamento β -globínico também afetam a expressão do gene γ -globina (*HBG*) (Sebastiani *et al*, 2015).

1.2.4.2.2. BCL11A

O gene *BCL11A*, situado no cromossoma 2p15, que codifica uma proteína dedo de zinco, foi primeiramente associado à patogenia de leucemias e linfomas (Menzel *et al*, 2007). Utilizando estudos de associação de genoma (GWAS-*Genome-Wide Association Studies*), polimorfismos no intrão 2 do gene *BCL11A* foram fortemente relacionados com o nível de HbF em pessoas saudáveis e em várias populações de doentes com β -talassémia e ACF. Pelo seu efeito na concentração de HbF, *BCL11A* modifica as manifestações clínicas de ambas as doenças (Menzel *et al*, 2007; Sedgewick *et al*, 2008). Dos três principais QTLs moduladores dos níveis de HbF (*Xmnl-HBG2*, *HMIP* e *BCL11A*), o *BCL11A* foi o que se correlacionou mais fortemente com a expressão da HbF (Sedgewick *et al*, 2008; Steinberg & Sebastiani, 2012).

O genótipo *BCL11A* que está associado a elevados níveis de HbF está também associado à redução da expressão da proteína BCL11A (Bhanushali *et al*, 2015a). Sítios de ligação para BCL11A foram descritos em HS3 do LCR e uma região intergénica situada entre os genes γ -globina e δ -globina utilizando técnicas de imunoprecipitação da cromatina (Akinsheye *et al*, 2011). Assim, a proteína BCL11A liga-se a regiões controlo distais e reconfigura o agrupamento β -globínico humano pelo *looping* cromossómico. Na presença de BCL11A, o LCR e o 3'HS1 interagem preferencialmente com os genes adultos (β -globina) ativos transcricionalmente nas células eritroides do tipo adulto. Na ausência de BCL11A, o *looping* intra-cromossomal é reconfigurado de tal modo que o LCR e o 3'HS1 favorecem fortemente a ligação aos genes fetais (γ -globina). Uma vez que o BCL11A não se liga aos promotores dos genes γ é provável que outros fatores cooperem com o BCL11A no silenciamento. Assim foi sugerido que proteínas como SOX6 podem atuar como um cofator da BCL11A na mediação do *switching* globínico e no silenciamento da transcrição dos genes γ -globina (Xu *et al*, 2010).

Entre os SNPs mais estudados, está o SNP rs11886868 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11886868). Vários estudos indicam que a presença do alelo C neste SNP está associado com valores de HbF mais elevados (Bhanushali *et al*, 2015b; Pereira *et al*, 2015; Uda *et al*, 2008).

1.2.4.3. Sintase do óxido nítrico endotelial

O endotélio desempenha um papel importante no controlo do tónus muscular através da produção de NO. Este é um potente agente vasodilatador, antioxidante, antiadesivo e antitrombótico que é sintetizado nas células endoteliais a partir do substrato L-arginina e de oxigénio pela ação da enzima sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS- *endothelial nitric oxide synthase*) (Sharan *et al*, 2004; Thakur *et al*, 2014). O gene que codifica esta enzima localiza-se no cromossoma 7, em 7q35-36 (Tantawy *et al*, 2015).

Na drepanocitose observa-se um estado de resistência ao NO mediado pela inativação do NO pela Hb plasmática libertada na hemólise (Coelho *et al*, 2014). Para além disso também existe um aumento de arginase que degrada a arginina, precursor do NO. Como este atua como um vasodilatador endógeno, a sua depleção promove a vasoconstrição. Assim, as condições oxidativas produzidas quer pela hemólise dos eritrócitos quer pelas células endoteliais ativadas inibem a atividade da eNOS e podem modificar as manifestações clínicas da doença (Conran & Costa, 2009; Sharan *et al*, 2004).

O nível de NO no plasma tem sido associado a variações alélicas do gene *eNOS* (Tsukada *et al*, 1998). Entre as variantes mais estudadas responsáveis pela variação do nível de NO, estão incluídos um polimorfismo na região do promotor, o rs2070744 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2070744), outro no exão 7, o rs1799983 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799983) e a repetição em tandem de número variável (VNTR-variable number tandem repeat) no intrão 4 do gene *eNOS*. Estes polimorfismos têm sido associados com várias doenças como o enfarte do miocárdio (Kunns *et al*, 2002), aterotrombose (Voetsch *et al*, 2004), artrite reumatoide (Melchers *et al*, 2006) e doença cardíaca coronária (Cattaruzza *et al*, 2004) na população em geral. Na AFC, um estudo considerou que a presença do alelo C do SNP rs2070744, que reduz significativamente a atividade do promotor do gene *eNOS* (Nakayama *et al*, 1999; Sharan *et al*, 2004), está associada com a síndrome torácica aguda (Sharan *et al*, 2004). Por outro lado o alelo T parece ter um efeito protetor na hemólise na ACF, por ser associado com menores níveis de bilirrubina (Coelho *et al*, 2014). Um estudo recente sugeriu que alelo 4a do VNTR intrão 4 do gene *eNOS* está relacionado com disfunção endotelial e vasculopatia na DCF (Tantawy *et al*, 2015). Outro estudo encontrou associação do haplótipo 4a-T-C (alelo 4a do VNTR intrão 4, rs1799983 e rs2070744) com doentes com DCF com fenótipo severo, comparativamente ao haplótipo 4b-G-T que foi associado com um fenótipo menos severo (Nishank *et al*, 2013).

1.2.4.4. Hemoxigenase 1

Os eritrócitos falciformes têm elevadas taxas de lise, libertando grande quantidade de Hb no plasma. Cada molécula de Hb possui 4 grupos heme, este quando libertado da Hb induz inflamação vascular que leva ao *stress* oxidativo em indivíduos com ACF (Bean *et al*, 2012).

A hemoxigenase (HO) é a principal enzima que catalisa a oxidação do grupo heme para gerar várias moléculas biologicamente ativas nomeadamente, o monóxido de carbono, a biliverdina e ião ferroso. O monóxido de carbono afeta várias funções celulares, incluindo inflamação, proliferação e apoptose. Já a biliverdina é subsequentemente reduzida a bilirrubina, ambas tendo propriedades antioxidantes. O ião ferroso induz a expressão da ferritina, a qual é crucial para o armazenamento do ferro (Maines, 1988). Existem 3 isoformas de hemoxigenases que são o produto de diferentes genes. A isoforma induzível, HO-1 é normalmente expressa em vários tecidos como o fígado, baço, pulmão, cérebro, e endotélio, contudo é altamente induzível em resposta a uma variedade de estímulos, como heme, oxidantes, hipoxia e certas citocinas, de forma a proteger as células contra danos oxidativos e inflamatórios. O efeito citoprotetivo de HO-1 pode ser mediado através de efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da degradação do heme, bem como a ação de alguns dos seus produtos de catabolismo (Bean *et al*, 2012).

O gene que codifica a HO-1 é o *HMOX-1*, localizado em 22q12 (Shibahara, 2003). Vários estudos têm analisado polimorfismos no gene *HMOX-1* que podem influenciar o nível de hemoxigenase. Duas variantes no promotor do gene *HMOX-1*, o SNP rs2071746 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2071746) e uma região polimórfica constituída por repetições de 2 nucleótidos (GT)_n (STR - *Short Tandem Repeat*), o rs3074372 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3074372), têm sido associadas com a modulação dos níveis de hemoxigenase. A variante A do SNP rs2071746 foi descrita como conferindo uma maior atividade ao promotor do gene (Ono *et al*, 2004). Quanto à região polimórfica rs3074372, evidências sugerem que pessoas com um menor número de repetições GT têm uma maior expressão de hemoxigenase induzível (Hirai *et al*, 2003; Taha *et al*, 2010). Um estudo encontrou uma associação entre menor número de repetições GT e uma menor taxa de hospitalização por síndrome torácica aguda em crianças com DCF (Bean *et al*, 2012).

1.2.4.5. Redutase do metilenotetrahidrofolato

A hiperhomocisteinemia é um fator de risco estabelecido para doenças arteriais, incluindo acidente vascular cerebral, enfarte do miocárdio e doença arterial periférica (Neto *et al*, 2006). Em circunstâncias normais, a homocisteína é remetilada em metionina e caso necessário em folato. Nos doentes com ACF, a hemólise crônica provoca um elevado requerimento de folato necessário para a eritropoiese normal (Cumming *et al*, 1999). Indivíduos que apresentam uma deficiência em folato apresentam maiores níveis de homocisteína no sangue, e níveis mais elevados de homocisteína foram descritos em doentes SS com acidente vascular cerebral (Houston *et al*, 1997).

A redutase do metilenotetrahidrofolato (MTHFR-*methylenetetrahydrofolate reductase*) é uma enzima que catalisa a redução de 5,10- metilenotetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato, uma das principais formas de folato no plasma e um dador de carbono na remetilação da homocisteína a metionina. A enzima é, portanto, responsável por reduzir os níveis de homocisteína no plasma (Ramkaran *et al*, 2015). O gene que codifica a enzima MTHFR localiza-se no cromossoma 1, em 1p36.3 (Heijmans *et al*, 2003). Entre os polimorfismos estudados neste gene está o SNP rs1801133 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801133) no exão 4 do gene *MTHFR* (Teng *et al*, 2013), em que a substituição de C para T, leva à substituição do aminoácido valina por alanina. Esta substituição dá origem a uma forma mais termolábil do MTHFR, que causa uma diminuição da atividade enzimática (Lorenz *et al*, 2014). Vários estudos já associaram o genótipo TT a níveis aumentados de homocisteína no plasma (Anderson *et al*, 1997; Clarke *et al*, 2012; Nienaber-Rousseau *et al*, 2013). Na AFC, também já têm sido feitos estudos que associam a presença do alelo T com complicações características da doença (Hatzlhofer *et al*, 2012; Neto *et al*, 2006; Kutlar *et al*, 2001).

1.2.4.6. Mieloperoxidase

As infeções constituem uma causa comum de hospitalização em doentes com ACF. Embora muitos destes doentes tenham redução da função esplénica, os mecanismos que os tornam mais suscetíveis à infeção ainda não estão completamente compreendidos (Costa *et al*, 2005).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima lisossomal encontrada em neutrófilos e monócitos e desempenha um papel importante no sistema de defesa do hospedeiro, proporcionando uma atividade microbicida contra um grande número de microrganismos. A deficiência em MPO está associada com uma maior ocorrência de processos inflamatórios (Costa *et al*, 2005; Barbosa *et al*,

2014). O gene que codifica a enzima MPO localiza-se no cromossoma 17, em 17q23.1 (Hamajima *et al*, 2001). Entre os polimorfismos estudados para este gene está o SNP rs2333227 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2333227), localizado na região do promotor deste gene (G>A, na posição -463). Foi demonstrado que este polimorfismo reduz significativamente a transcrição do gene da MPO (Costa *et al*, 2005; London *et al*, 1997) e que pode modular a severidade de várias doenças como o cancro do pulmão (London *et al*, 1997), a doença periodontal (Meisel *et al*, 2002) e a aterosclerose (Nikpoor *et al*, 2001). As evidências de um estudo sugeriram que a variante A deste aumenta a suscetibilidade a infeções em doentes com ACF (Costa *et al*, 2005). Um outro estudo mais recente considerou que doentes com ACF homozigóticos AA tinham efeitos aumentados de asplenia (Barbosa *et al*, 2014).

1.2.4.7. Haptoglobina

A ACF é caracterizada por uma libertação em excesso de heme livre, o que leva à formação de espécies reativas de oxigénio e produz stress oxidativo (Adekile & Haider, 2010).

A haptoglobina (Hp) consiste numa glicoproteína de fase aguda presente no plasma, que contém duas cadeias polipeptídicas α e duas cadeias β , ligadas covalentemente por pontes dissulfido (Wobeto *et al*, 2008). A sua principal função é ligar-se com alta afinidade à Hb livre, formando um complexo que não pode ser filtrado pelo rim e que será eliminado por hepatócitos. Ao fazer parte do mecanismo de eliminação da Hb livre pós-hemólise, a Hp protege o organismo de diversas lesões oxidantes por parte do ferro (Barbosa *et al*, 2014; Chintagari *et al*, 2015).

O locus *Hp* localiza-se no cromossoma 16, em 16q22.1, é polimórfico com dois alelos principais codominantes, Hp1 e Hp2. Da sua combinação resultam três genótipos/fenótipos principais (Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2), que correspondem a proteínas com características físico-químicas e funcionais distintas. As cadeias β são idênticas em todos os fenótipos de Hp e as variantes devem-se à presença das cadeias α (Dzudzor *et al*, 2014). As frequências alélicas de Hp são marcadas por distribuições geográficas, de tal modo que uma menor frequência do alelo Hp1 é encontrada sudeste da Ásia e uma maior frequência na África e América do Sul (Adekile & Haider, 2010). Ainda existe um quarto fenótipo, Hp0, caracterizado pela ausência ou redução dos níveis de Hp no plasma, mostrando assim que Hp não é essencial para a sobrevivência humana. Este fenótipo pode ser secundário ao aumento de consumo ou redução de produção de Hp, como ocorre durante a hemólise vascular ou doenças de fígado, respetivamente, ou pode ser geneticamente determinada (Carter & Worwood, 2007; Wobeto *et al*, 2008).

Cada um dos fenótipos tem diferente afinidade para a Hb. Hp1-1 capta com maior afinidade a Hb livre, reduzindo respostas inflamatórias associadas. O Hp 2-2 e o Hp 2-1 apresentam menor afinidade de ligação à Hb livre, sendo o Hp 2-2 o que apresenta afinidade mais baixa (Langlois & Delanghe, 1996; Wobeto *et al*, 2008). Têm sido feitos estudos que associam os fenótipos Hp com diferentes condições clínicas. O fenótipo Hp2-2 foi associado com enfarte do miocárdio como um preditor da gravidade e da extensão da lesão do miocárdio em pacientes com diferentes fatores de risco (Roguin *et al*, 2001). Por outro lado Hp1-1 parece proteger contra aterosclerose e outras complicações vasculares da diabetes *mellitus* também sendo protetora da hemorragia da retina (Adekile & Haider, 2010). Existem estudos que mostram uma associação entre o fenótipo Hp1-1 e a DCF (Moreira & Naoum, 1990; Santos *et al*, 2011).

1.2.4.8. Fosfatase ácida do eritrócito

A fosfatase ácida do eritrócito (FA) também designada ACP1, é uma enzima citoplasmática que pertence a uma grande família enzimática das fosfotirosina proteína fosfatases e que catalisa a hidrólise de fosfotirosinas presentes em várias proteínas. Esta enzima de baixo peso molecular codificada pelo gene *ACP1* é polimórfica (três alelos A, B e C) (Silva *et al*, 2001, 2006), sendo a sua função modulada por ROS (Guerra *et al*, 2002). Das ações descritas, uma das mais importantes é a inibição da resposta a fatores de crescimento nomeadamente ao fator de crescimento derivado das plaquetas, através da hidrólise das fosfotirosinas de proteínas fosforiladas que ficam inativas. Outras ações são a regulação da glicólise, através da defosforilação da proteína de banda 3 e a transdução de sinais de mecanismos bioquímicos diversos intracelulares (Silva *et al*, 2001). Estudos indicam associação entre as atividades da redutase transmembranar (RTM) e da fosfatase sugerindo um papel nas reações redox de transdução de sinal mediadas pelos processos de fosforilação / defosforilação de tirosinas em proteínas (Silva *et al*, 2006).

1.2.4.9. Redutase da metahemoglobina

Os eritrócitos, devido à sua função de transporte de O₂ e dióxido de carbono (CO₂), encontram-se expostos a ROS. Estes possuem enzimas com funções antioxidantes, que estão localizadas quer na membrana celular quer no citoplasma. São estas enzimas que permitem garantir a integridade celular à sobrecarga do estado redox (Cruz *et al*, 1995).

Uma enzima que permite garantir a integridade celular à sobrecarga do estado redox é a enzima citoplasmática redutase da metahemoglobina (RMTHb), que consiste numa flavoproteína oxidoreductase existente nos eritrócitos que catalisa a redução de metahemoglobina (metaHb) a hemoglobina na presença de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) e de um transportador de eletrões intermediário. Assim, um aumento da concentração de oxidantes no eritrócito está envolvido na ativação do RMTHb (Kuma, 1981). Deficiência da RMTHb pode resultar em metahemoglobinemia, uma patologia caracterizada por um excesso de metaHb nos eritrócitos e que diminui a capacidade transportadora de oxigénio nestas células (Jeney *et al*, 2002).

Como referido anteriormente, na ACF há uma maior produção de espécies reativas de oxigénio. Tal irá predispor a hemoglobina à oxidação resultando na formação de metahemoglobina, uma forma disfuncional da hemoglobina incapaz de transportar oxigénio (Caboot *et al*, 2012; Naoum, 2000). Deste modo, a atividade da enzima RMTHb poderá ter um papel importante no fenótipo clínico destes doentes.

1.2.4.10. Redutase transmembranar

Outra enzima que permite garantir a integridade celular à sobrecarga do estado redox é a redutase transmembranar, que permite a transferência dos eletrões para o exterior da célula, reduzindo deste modo os aniões permanentes (Cruz *et al*, 1995). É componente de um sistema redox transmembranar presente em todas as células, em particular nas células endoteliais, exprimindo-se no eritrócito as atividades mais elevadas por célula, que reduz o ferricianeto de potássio, na dependência do NADH e é ativada por alguns fatores de crescimento e também por agentes oxidantes extracelulares (Silva *et al*, 2006). A redutase transmembranar desempenha uma função importante na manutenção do equilíbrio redox no glóbulo visto ser responsável pela remoção de eletrões ao nível da membrana. Logo, a diminuição da sua atividade resulta no aumento da sobrecarga oxidante na célula, sendo necessários outros sistemas para tentar compensar esta falha (Grebing *et al*, 1984).

1.2.5. Terapias no tratamento da anemia das células falciformes

A prevenção de complicações precoces e terapias específicas para diferentes manifestações clínicas são importantes no plano global de tratamento para doentes com ACF. Analgésicos são essenciais para as pessoas que sofrem de crises de dor, assim como vacinação e profilaxia com penicilina para prevenir infecções. Além disso também é importante uma boa hidratação e suplementação com vitaminas. O ácido fólico é particularmente aconselhável para estes doentes, pois reduz os níveis de homocisteína (Roseff, 2009).

Apesar de várias terapias farmacológicas terem sido estudadas, apenas se comprovou que a hidroxiureia (HU) reduz a incidência de crises dolorosas e síndrome torácica aguda. A HU é um inibidor da redutase ribonucleótida que provoca um aumento da expressão da HbF originando uma menor morbidade e mortalidade associada a esta doença (Schnog *et al*, 2004). Além disso, também reduz a contagem de leucócitos, reticulócitos e plaquetas e influencia o metabolismo do óxido nítrico (Roseff, 2009). Os efeitos da HU não são imediatos, levando alguns meses até se tornarem efetivos (Charache *et al*, 1995). Além disso estima-se que 40% dos doentes não respondam ao tratamento. Embora seja relativamente segura, existe a possibilidade de efeitos secundários a longo prazo, como mielosupressão e úlceras nas pernas (Schnog *et al*, 2004). Alguns doentes têm de interromper o tratamento porque a sua contagem de leucócitos se torna muito baixa. Existe ainda um potencial risco mutagénico (Imaga, 2013). Esta terapia é correntemente limitada a doentes severamente afetados e requer uma monitorização intensiva do doente (Schnog *et al*, 2004).

As transfusões sanguíneas devem ser indicadas em situações específicas para doentes com sintomas e sinais de anemia crónica. Esta terapêutica dilui a HbS com a HbA o que é vantajoso para os doentes. Além disso, a transfusão irá suprimir a eritropoiese próprio do paciente. Contudo pode haver complicações relacionadas com a transfusão como sobrecarga em ferro e infeções (Roseff, 2009).

O transplante de medula óssea, o transplante com células estaminais de sangue periférico e o transplante com sangue do cordão umbilical são outras estratégias que poderão ser utilizadas para o tratamento da doença. Devido à morbidade e mortalidade secundária ao transplante, além da dificuldade em encontrar dadores compatíveis, é importante escolher cuidadosamente os pacientes com doença grave, tais como aqueles com AVCs recorrentes (Roseff, 2009).

Cada vez mais são pesquisados novos tratamentos adjuvantes para a doença das células falciformes (Imaga, 2013), sendo o suplemento alimentar citrulina um bom candidato nesta terapêutica.

1.2.5.1. Citrulina

A citrulina (CIT) (Figura 1-6) é um aminoácido não essencial e não proteico que participa no ciclo da ureia e constitui um produto da via da enzima sintase do óxido nítrico (NOS- *Nitric Oxide Synthase*). É produzido naturalmente pelo organismo e também é encontrado em alguns alimentos como melancias, pepinos, abóboras e melões. A nomenclatura da citrulina vem da palavra em latim para melancia, *Citrullus vulgaris*, porque foi pela primeira vez isolada a partir desta, em 1930, sendo que esta é muito rica neste aminoácido (Kaore *et al*, 2013; Moinard & Cynober, 2007). A sua função básica é a desintoxicação da via da amónia convertendo-a em ureia, podendo funcionar também como um potente captador de radicais hidroxilo (Kaore *et al*, 2013; Waugh *et al*, 2001).

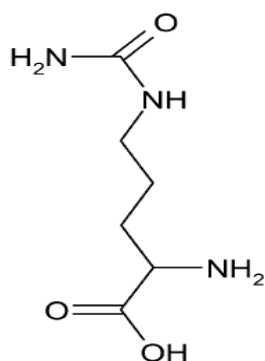


Figura 1-6- Estrutura química do aminoácido citrulina (Adaptado de Moinard & Cynober, 2007).

A CIT é sintetizada principalmente nos enterócitos a partir do aminoácido glutamina e é reciclada com formação de ARG em muitos outros tecidos extra hepáticos, nomeadamente no rim e nas células endoteliais. Os responsáveis por essa reciclagem são as enzimas do ciclo da ureia, arginina sucinato sintetase (ASS) e arginino sucinato liase (ASL), que são expressos nestas células. Por isso, a CIT é essencial para produzir ARG, por sua vez, ARG é necessária para produzir NO, que atua como um vasodilatador endógeno (Kaore *et al*, 2013).

Foram realizados vários estudos sobre a suplementação com ARG. Estudos demonstraram que a suplementação com ARG melhorou a disfunção endotelial em doentes com diabetes (Pieper, 1998) e hipercolesterolemia (Creager *et al*, 1992). Estudos também demonstraram uma melhoria na produção de NO o que pode ser útil em doenças cardiovasculares associadas com disfunção endotelial como hipertensão, insuficiência cardíaca e aterosclerose (Kaore *et al*, 2013). Em doentes com DCF também já foram realizados estudos que sugerem que a suplementação em ARG nestes doentes pode ser benéfica (Morris *et al*, 2000, 2003). Contudo, a ARG administrada oralmente é em parte perdida por transformação nas células intestinais em ornitina e ureia por ação da arginase, aí presente em grandes quantidades. Além disso, o facto de a arginina ser retomada e metabolizada no fígado e produzir ureia levanta questões sobre a segurança da suplementação em ARG, pois a arginina é suscetível de causar ureogénese excessiva (Curis *et al*, 2005).

A CIT é um bom candidato alternativo à suplementação em ARG, pois restaura a produção de NO em situações de disponibilidade limitada de ARG (Curis *et al*, 2005; Kaore *et al*, 2013). Para além disso a CIT administrada oralmente não é capturada pelo fígado. Um estudo em indivíduos saudáveis demonstrou que a suplementação com CIT oral aumenta os níveis de ARG no sangue mais eficazmente do que a suplementação com ARG (Kuhn *et al*, 2002). Além disso, a administração a curto prazo de CIT é segura e bem tolerada. Num estudo realizado não foram observados efeitos adversos em indivíduos saudáveis que foram suplementados com diferentes dosagens de CIT (Moinard *et al*, 2008). A hipercitrulinémia pode ocorrer como uma disfunção do gene ASS ou de transporte de aspartato para esta enzima. Contudo, esta patologia parece estar relacionada com a acumulação de compostos envolvidos na síntese de CIT, perturbações do ciclo da ureia e elevados níveis de amónia (Romero *et al*, 2006). Atualmente não existe documentação científica no que respeita a interações entre a citrulina e fármacos (Kaore *et al*, 2013).

Foram realizados estudos que consideraram benéfica a suplementação com citrulina em algumas condições médicas como doenças cardiovasculares (Romero *et al*, 2006), disfunção erétil (Cormio *et al*, 2011; Shiota *et al*, 2013), hipertensão pulmonária (Smith *et al*, 2006), síndrome do intestino curto (Osowska *et al*, 2004), desnutrição proteico-calórica no envelhecimento (Osowska *et al*, 2006), hiperamonemia (Stephens & Levy, 1994), hiperlipidemia (Kirsh *et al*, 2011) e infeções (Norris *et al*, 1995).

Os doentes com AFC apresentam uma menor biodisponibilidade nas células endoteliais de arginina. A menor disponibilidade de arginina, nesta situação em particular, resulta do aumento no plasma da enzima arginase, a qual é responsável pela degradação da arginina em ureia e ornitina, após a hemólise dos eritrócitos. A suplementação com citrulina poderá ser uma forma mais eficaz de

aumentar os níveis plasmáticos de arginina necessária como um substrato na via arginina- óxido nítrico para nitrovasodilatação endógena e vasoproteção (Kaore *et al*, 2013; McCarty, 2010). Até ao momento, foi realizado apenas um ensaio clínico piloto de fase II de suplementação em citrulina (0,1 g/kg duas vezes ao dia) em indivíduos com DCF, em que foi observado um impacto bastante favorável nos sintomas observados (Waugh *et al*, 2001).

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral identificar fatores genéticos e bioquímicos moduladores do fenótipo da anemia das células falciformes no geral e em resposta à terapêutica de suplementação com citrulina.

Mais especificamente pretende-se:

- Confirmar a presença da mutação drepanocítica (HBB:c.20A>T) nos indivíduos diagnosticados clinicamente com ACF.
- Estudar variantes genéticas em genes candidatos a moduladores de fenótipo, nomeadamente: a deleção de 3,7 Kb no agrupamento génico da α -globina, os SNPs rs7482144, rs2070972 e rs10128556 do haplótipo do agrupamento génico da β -globina, o SNP rs11886868 no gene *BCL11A*, os SNPs rs2070744 e rs1799983 e o VNTR no intrão 4 no gene *eNOS*, o SNP rs2071746 e o STR rs3074372 no gene *HMOX-1*, o SNP rs1801133 no gene *MTHFR*, o SNP rs2333227 no gene *MPO* e os genótipos/fenótipos Hp 1-1, Hp1-2 e Hp 2-2 da haptoglobina.
- Determinar e caracterizar através de análise estatística a associação entre vários parâmetros hematológicos ou bioquímicos (hemoglobina total, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM) e os fatores genéticos estudados.
- Determinar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os doentes e populações controlo para os fatores genéticos e bioquímicos estudados.
- Avaliar o efeito da suplementação com citrulina (0,1 mg/Kg/dia) como suplemento alimentar em doentes com ACF através de um estudo do tipo observacional, ao longo do tempo (mês 0, mês 1, mês 3 e mês 6) com análise estatística da evolução dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

3. Metodologia

3.1. Amostra

3.1.1. Amostra populacional

Este estudo incidiu sobre uma amostra de indivíduos com anemia das células falciformes, previamente caracterizada do ponto de vista clínico e hematológico. Foram estudados 26 indivíduos em idade pediátrica, seguidos no Hospital de Dona Estefânia. Os indivíduos têm origem africana. Destes indivíduos, 15 iniciaram o protocolo de suplementação em Citrulina (0,1 mg/Kg/dia), sendo avaliados no estado basal, ao final de 1 mês, 3 meses e 6 meses.

Ao longo do estudo foram também utilizados diferentes grupos como populações controlo.

3.1.2. Amostra biológica

Em todos os casos, após consentimento informado do doente (Anexo I), procedeu-se à colheita de amostra de sangue periférico em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA-*Ethylenediaminetetraacetic acid*). Para as determinações genéticas foi feita a extração de DNA a partir sangue. Para as diferentes determinações bioquímicas utilizaram-se plasma, eritrócitos lavados ou hemolisados, todos obtidos a partir de sangue total. Os procedimentos para separação destes componentes do sangue encontram-se descritos no Anexo II.

3.2. Métodos

3.2.1. Determinações genéticas

3.2.1.1. Extração e quantificação de DNA

Para 12 amostras a extração do DNA foi realizada pelo método de extração não enzimática designado de *salting-out* (Anexo III) e para 3 amostras, a extração de DNA foi feita através do Kit NZY Blood gDNA Isolation, NZYTech (https://www.nzytech.com/files/brochures/MB136_NZY%20Blood%20gDNA%20Isolation%20kit.pdf). O procedimento deste Kit combina a eficiência de um tampão de lise contendo Proteinase K com as propriedades de uma coluna à base de sílica. Depois de se preparar o lisado, o DNA foi absorvido na

coluna e outros contaminantes, como proteínas ou sais, foram removidos por lavagens posteriores. O DNA purificado foi eluído num tampão de eluição alcalino.

Para a quantificação (ng/μl) e obtenção do grau de pureza do DNA, determinou-se, através de um método espectrofotométrico (Nanodrop, *ND-1000*, Thermo Scientific), as razões de absorvência entre os comprimentos de onda 260 e 280nm (A260/280) e entre os comprimentos de onda 230 e 280nm (A230/280).

3.3.1.2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*), Gap-PCR e PCR alelo-específico

Foram amplificados por PCR vários fragmentos diferentes do DNA, um para pesquisa da mutação drepanocítica, três no agrupamento génico da β-globina para determinação do haplótipo, um no gene *BCL11A*, três no gene *eNOS*, um no gene *MPO* e um no gene *MTHFR*. Os tampões utilizados nas reações de PCR encontram-se descritos no Anexo IV. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, as condições da reação e os tamanhos dos fragmentos, estão descritos nas Tabelas V-1, V-2, V-3 e V-4 do Anexo V.

O Gap-PCR é uma metodologia variante do PCR utilizada para determinar os pontos de quebra de deleções através do uso de oligonucleótidos iniciadores localizados externamente e o mais próximos possível dos pontos de quebra. Através desta metodologia podem ser detetadas deleções no agrupamento génico da α-globina, nomeadamente a deleção – α3,7. O Gap-PCR foi realizado segundo as condições descritas na Tabela VI-1 do Anexo VI.

O PCR alelo-específico ou PCR baseado no sistema de mutação refratário à amplificação (ARMS - *amplification-refractory mutation system*) permite a discriminação eficiente de SNPs específicos de alelo através do emparelhamento perfeito dos nucleótidos da extremidade 3' do oligonucleótido. Neste caso são usados 3 oligonucleótidos, um reverso e dois diretos com sequências diferentes, podendo amplificar dois produtos de tamanhos diferentes. Realizou-se o PCR alelo-específico, segundo as condições descritas na Tabela VII-1 do Anexo VII, para o SNP rs2071746 no gene *HMOX-1* que posteriormente também serviu para uma análise por GeneScan.

Os resultados destas metodologias foram visualizados após eletroforese dos produtos de PCR num gel de agarose com concentração adaptada ao tamanho dos fragmentos amplificados e corado com brometo de etídeo numa concentração de cerca 1μL por cada 12,5 mL de solução TAE ou TBE. A visualização da eletroforese foi feita em transiluminadores (*GenoSmart*, *VWR* e *Uvitec Cambridge*).

3.3.1.3. Ensaios de restrição

A mutação drepanocítica suprime o local de restrição da endonuclease Bsu36I, o que permite distinguir o alelo mutado do normal. As condições da restrição encontram-se na Tabela VIII-1 do Anexo VIII. Para o estudo dos SNPs no agrupamento génico da β -globina para determinação dos haplótipos, as condições de restrição e enzimas para cada polimorfismo estão descritas nas Tabela VIII-2 do Anexo VIII. Para o estudo dos SNPs no gene *BCL11A*, no gene *eNOS*, no gene *MPO* e no gene *MTHFR* as condições de restrição e enzimas para cada polimorfismo estão descritas nas Tabela VIII-3 do Anexo VIII. A deteção e identificação dos produtos da restrição também foram efetuadas após eletroforese em gel de agarose e a visualização feita através de transiluminadores (*GenoSmart*, *VWR* e *Uvitec Cambridge*).

3.3.1.4. GeneScan

Os produtos de PCR, com as condições de PCR descritas na Tabela VII-1 do Anexo VII, para a caracterização da variação em número do tipo STR (GT)_n, rs3074372 no gene *HMOX1*, foram analisados utilizando o sequenciador 3130X Genetic Analyser, ABI Prism (Applied Biosystem), com deteção para marcadores fluorescentes utilizando o *software* de análise GeneScan 3.7. Esta análise só é possível devido à marcação dos oligonucleótidos com fluorescência (FAM - 6-carboxifluoresceína), permitindo assim a diferenciação por tamanho dos fragmentos de DNA analisados. Os fragmentos marcados foram detetados por eletroferogramas que mostram picos de fluorescência identificados pelo respetivo tamanho dos fragmentos em pares de bases.

Para a análise do número de repetições GT em *HMOX1*, fez-se uma divisão em 3 classes de alelos: S com repetições $GT \leq 25$, M com repetições $25 < GT < 32$ repetições e L com repetições $GT \geq 32$.

3.3.2. Determinações bioquímicas

3.3.2.1. Determinação da concentração da mieloperoxidase

A determinação da concentração plasmática da MPO foi realizada utilizando o Kit Human Myeloperoxidase Immunoassay, R&D Systems (<https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dmye00b.pdf>). Esta técnica foi realizada pelo método imunoenzimático de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Um anticorpo monoclonal específico para a MPO pré-revestiu uma microplaca. As amostras foram pipetadas para os poços e a MPO presente ligou-se ao anticorpo. Após lavagem para remover quaisquer substâncias não ligadas, adicionou-se um anticorpo policlonal marcado com uma enzima específica para a MPO. Realizou-se outra lavagem para a remoção de qualquer complexo anticorpo-enzima que não estivesse ligado. Adicionou-se uma solução de substrato aos poços e desenvolveu-se uma cor que é proporcional à quantidade de MPO ligada no passo inicial. O desenvolvimento da cor foi parado e a intensidade da cor foi medida no espectrofotômetro.

3.3.2.2. Determinação dos genótipos/fenótipos da haptoglobina

Os fenótipos da haptoglobina foram separados a partir de plasma utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE - *polyacrylamide gel electrophoresis*) a 4,7% para separar estas cadeias e a sua presença foi detetada pela atividade peroxidásica do complexo hemoglobina/haptoglobina utilizando como substrato o-dianisidina. O procedimento encontra-se descrito no Anexo IX.

3.3.2.3. Determinação da atividade da fosfatase ácida

A atividade enzimática da FA das amostras foi determinada espectrofotometricamente por um método colorimétrico tendo como substrato o p-nitrofenilfosfato (pNPP) que após a incubação com a enzima foi desfosforilado formando-se o p-nitrofenol, que em meio alcalino se transformou em p-nitrofenolato (pNP). Este método, adaptado de Dissing, Dahl e Svansmark (Dissing *et al*, 1979), encontra-se descrito no Anexo X.

3.3.2.4. Determinação da atividade da redutase da metahemoglobina

A atividade da RMTHb foi determinada por espectrofotometria através da redução de ferricianeto de potássio com a oxidação de NADH por parte da enzima. Este método, adaptado de Board e colaboradores (Board & Pidcock, 1981), encontra-se descrito no Anexo XI.

3.3.2.5. Determinação da atividade da redutase transmembranar

A atividade da RTM foi determinada por espectrofotometria pela da conversão de ferricianeto em ferrocianeto pela redutase transmembranar da membrana dos eritrócitos e medida num espectrofotómetro. Este método, adaptado de Orringer e Roer (Orringer & Roer, 1979), encontra-se descrito no Anexo XII.

3.3.3. Tratamento estatístico

Os cálculos estatísticos foram realizados nos programas estatísticos SPSS 22.0 e Primer of Biostatistics 5.0, sendo o nível de significância estatística estabelecido para $p < 0,05$.

Para cada polimorfismo compararam-se as frequências genótípicas observadas com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), utilizando-se o teste do Qui-quadrado (χ^2) de Pearson.

A avaliação da normalidade da distribuição foi efetuada através do teste de Shapiro-Wilk.

As comparações entre doentes e populações controlo para testar as associações nos fatores genéticos foram feitas através de *Odds Ratio* (OR) e para os fatores bioquímicos foram utilizados os testes paramétricos T e não paramétricos Mann-Witney.

As associações entre os genótipos e os parâmetros hematológicos ou bioquímicos estudados foram pesquisadas pelos testes paramétricos ANOVA e teste T e pelos testes não paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Witney.

A avaliação do efeito da suplementação com citrulina foi efetuada através do teste paramétrico ANOVA e pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis e também foram feitas correlações recorrendo à correlação de Spearman.

4. Resultados

4.1. Caracterização da população em estudo

Estudou-se uma amostra populacional de 26 indivíduos, seguidos no hospital de Dona Estefânia, cujo perfil hematológico e clínico encaixava num fenótipo de anemia das células falciformes. Destes indivíduos, 18 eram do sexo masculino e 8 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 3 e os 19 anos de idade, mediana de 7 anos, uma idade média de 8,58 anos com desvio-padrão de 5,25 anos. Destes indivíduos, 15 iniciaram o protocolo de suplementação em citrulina. Os critérios de exclusão para o protocolo de suplementação em citrulina foram: atopia/asma, doença aguda, doença pulmonar não relacionada com ACF e crise hemolítica recente. Os restantes 11 indivíduos tinham já sido incluídos em estudos anteriores do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, pelo que algumas determinações genéticas já tinham sido realizadas (pesquisa da mutação drepanocítica, determinação do haplótipo e caracterização do SNP no gene *BCL11A*). As características hematológicas ou bioquímicas obtidas em laboratório hospitalar e disponíveis para este estudo foram: hemoglobina total, HbF, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos e neutrófilos, tanto no estado basal, como para os restantes meses para os doentes sujeitos ao suplemento de citrulina. O parâmetro HbF foi excluído das análises estatísticas uma vez que vários indivíduos estavam a ser medicados com hidroxiureia. Os dados basais foram utilizados para testar associação entre os parâmetros hematológicos ou bioquímicos e as variantes genéticas e para testar diferenças entre doentes e população controlo relativamente aos parâmetros bioquímicos determinados no estudo.

Para as determinações genéticas foram utilizados, como controlo, dados de frequências genotípicas na população africana. Para isso recorreu-se à base de dados *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>), para os SNPs estudados. Para o VNTR do intrão 4 de *eNOS* e para o STR rs2071746 em *HMOX-1*, estes dados não estavam disponibilizados, não sendo deste modo calculadas as diferenças entre a população em estudo e uma população controlo.

Para as determinações bioquímicas foram utilizados, como populações controlo, dados de estudos anteriores realizados na Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Como grupo controlo para a fosfatase ácida, redutase da metahemoglobina e redutase transmembranar foram utilizados dados de 78 crianças saudáveis provenientes do Hospital de São João, Porto. Destes indivíduos, 40 eram do sexo feminino e 38 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 10 e os 12 anos de idade, com mediana de 11,46 anos, idade média 11,43 de anos e desvio-padrão de 0,90 anos. Como grupo controlo para a mieloperoxidase foram utilizados dados de 34 de dadores de sangue saudáveis

provenientes do Instituto Português do Sangue, Lisboa. Todos os indivíduos eram do sexo masculino com idades compreendidas entre os 22 e os 64 anos, com uma idade média de 43,06 anos, mediana de 42,50 anos e desvio-padrão de 11,05 anos.

4.2. Determinações genéticas

Começou-se por avaliar a distribuição dos parâmetros hemoglobina, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM nos indivíduos em estudo. Na tabela 4-1 encontra-se a estatística descritiva destes parâmetros com o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os parâmetros que se consideraram ter distribuição normal ($p \geq 0,05$) foram a hemoglobina, HbS, RDW, reticulócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM utilizando-se na avaliação estatística testes paramétricos. Os parâmetros que se consideraram ter distribuição não normal ($p < 0,05$) foram a bilirrubina, LDH e leucócitos utilizando-se na avaliação estatística testes não paramétricos.

Tabela 4-1 - Estatística descritiva dos parâmetros hemoglobina, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM e teste de normalidade Shapiro-Wilk

Parâmetros	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Valor p* (Teste de normalidade Shapiro-Wilk)
Hemoglobina (g/dL)	23	8,63	8,80	6,30	11,50	1,29	0,952
HbS (%)	22	74,81	75,95	62,80	88,00	6,61	0,879
Bilirrubina (mg/dL)	12	2,41	1,81	1,26	5,57	1,52	0,001
LDH (U/L)	11	468,18	451	328	793	127,09	0,031
RDW (%)	10	21,99	22,05	17,20	25,70	2,32	0,790
Reticulócitos (%)	23	8,07	7,96	2,14	15,50	3,47	0,492
Leucócitos (células / μ L)	10	13640	1045	7000	33100	7448,98	0,001
Neutrófilos (células / μ L)	10	5101,50	5007,50	1580	8610	2107,34	0,978
FA (μ mol/g Hb/h)	14	368,61	347,10	217,74	605,44	107,1	0,585
MPO (ng/mL)	14	37,45	29,56	14,14	78,63	18,58	0,162
RMHb (μ mol/g Hb/min)	13	23,96	21,90	12,40	48,55	9,44	0,071
RTM (mmol/lcel/h)	4	5,17	4,90	4,21	6,65	1,05	0,485

*Considera-se a distribuição normal quando $p \geq 0,05$

4.2.1. Pesquisa da mutação drepanocítica

A análise sobre a presença da mutação drepanocítica foi efetuada por PCR-RFLP. Concluiu-se quanto à presença ou não da mutação drepanocítica através da interpretação do perfil eletroforético do gel de agarose tal como abaixo mencionado (Figura 4-1).

Após completar a análise de todas as amostras verificou-se que todos os indivíduos estudados eram homozigóticos para a mutação drepanocítica.

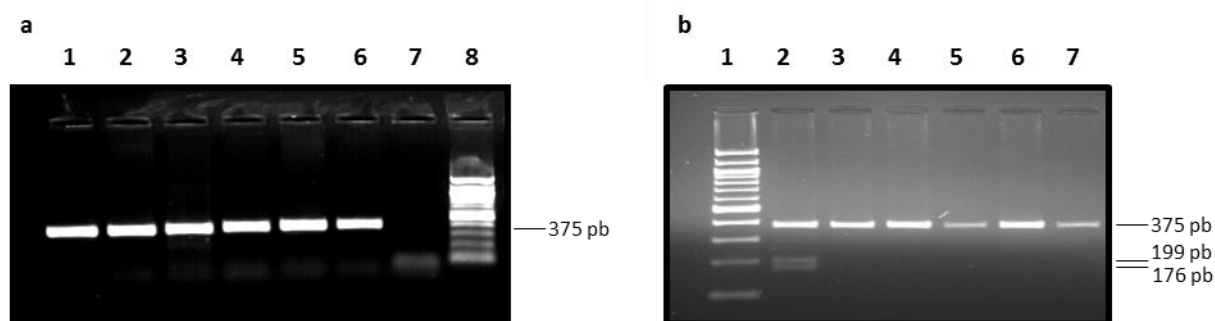


Figura 4-1 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região genômica contendo a mutação drepanocítica e b) dos fragmentos obtidos por restrição informativa acerca da presença da mutação drepanocítica. a) Imagem de um gel de agarose exemplificativa de uma amplificação por PCR de um fragmento contendo a região 5' do gene da beta-globina. Canais 1 a 5: produto de PCR de indivíduos em estudo. Canal 6: produto de PCR de um controle positivo. Canal 7: controle negativo. Canal 8: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific) b) Imagem de um gel de agarose exemplificativa dos fragmentos obtidos no ensaio de restrição com a enzima de restrição Bsu36I. Canal 1: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific). Canal 2: Controle positivo heterozigótico para a mutação drepanocítica. Canais 3 a 7: Homozigotia para a mutação drepanocítica. Está indicado o tamanho do fragmento de PCR e os tamanhos dos fragmentos de restrição (pb).

4.2.2. Caracterização do haplótipo no agrupamento génico da β -globina e associação com os parâmetros estudados

Para a caracterização do haplótipo no agrupamento génico da β -globina são habitualmente, analisados oito polimorfismos no agrupamento génico da β -globina, no entanto, neste estudo só foram caracterizados três polimorfismos, pois sendo a população em estudo constituída por africanos ou descendentes de africanos, estes locais polimórficos não influenciariam a determinação do haplótipo.

Foram analisadas as amostras de DNA pela metodologia de PCR-RFLP, para cada um dos 3 locais polimórficos. Seguidamente apresentam-se imagens de géis representativos para cada um dos SNPs estudados (Figuras 4-2, 4-3 e 4-4).

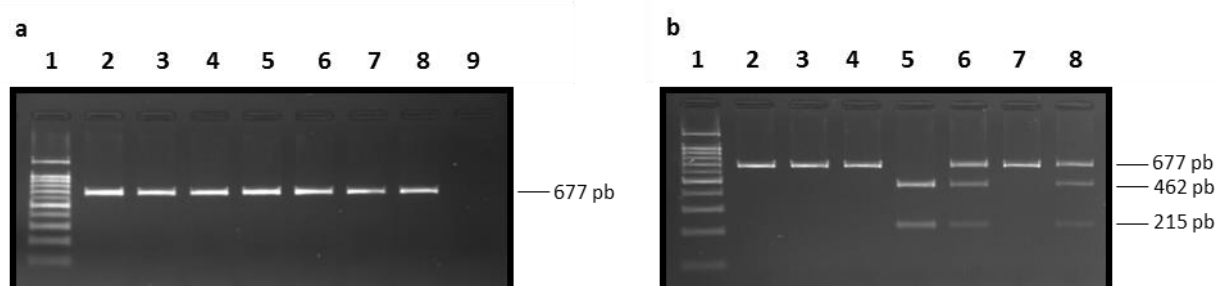


Figura 4-2 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene $\epsilon\gamma$ -globina contendo o SNP rs7482144 e b) dos fragmentos obtidos por restrição informativa para determinação do haplótipo - restrição XmnI. a) Imagem de um gel de agarose exemplificativa de uma amplificação por PCR de um fragmento contendo o SNP rs7482144 do gene $\epsilon\gamma$ -globina. Canal 1: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific). Canais 2 a 7: produto de PCR de indivíduos em estudo. Canal 8: produto de PCR de um controle positivo. Canal 9: controle negativo b) Imagem de um gel de agarose exemplificativa dos fragmentos obtidos no ensaio de restrição com a enzima de restrição XmnI. Canal 1: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific). Canais 2, 3, 4 e 7: Genótipo CC. Canal 5: Genótipo TT. Canal 6: Genótipo CT. Canal 8: Controle positivo heterozigótico (CT). Está indicado o tamanho do fragmento de PCR e os tamanhos dos fragmentos de restrição (pb).

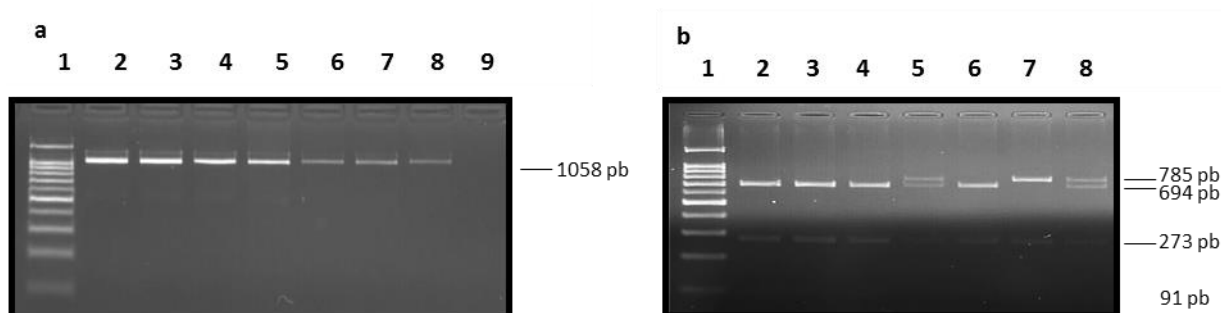


Figura 4-3 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene $\epsilon\gamma$ -globina contendo o SNP rs2070972 e b) dos fragmentos obtidos por restrição informativa para determinação do haplótipo - restrição HindIII. a) Imagem de um gel de agarose exemplificativa de uma amplificação por PCR de um fragmento contendo o SNP rs2070972 do gene $\epsilon\gamma$ -globina. Canal 1: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific). Canais 2 a 7: produto de PCR de indivíduos em estudo. Canal 8: produto de PCR de um controle positivo. Canal 9: controle negativo b) Imagem de um gel de agarose exemplificativa dos fragmentos obtidos no ensaio de restrição com a enzima de restrição HindIII. Canal 1: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific). Canais 2, 3, 4 e 6: Genótipo TT. Canal 5: Genótipo GT. Canal 7: Genótipo GG. Canal 8: Controle positivo heterozigótico (GT). Está indicado o tamanho do fragmento de PCR e os tamanhos dos fragmentos de restrição (pb).

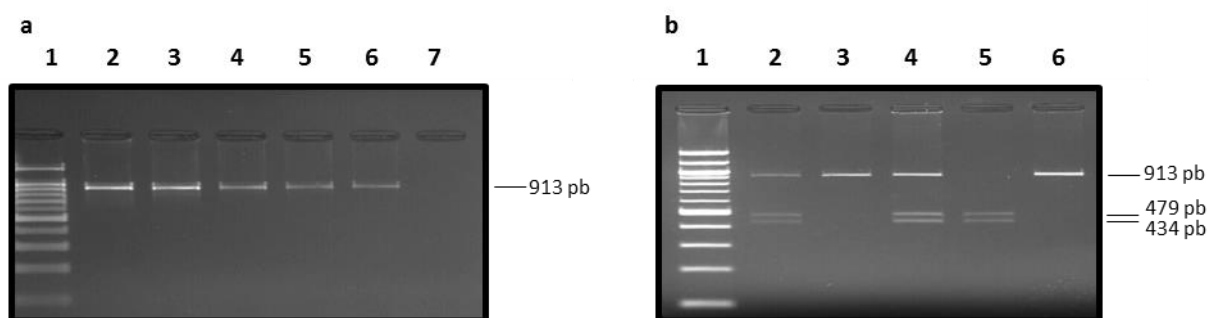


Figura 4-4 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da extremidade 3' do $\psi\beta$ contendo o SNP rs968857 e b) dos fragmentos obtidos por restrição informativa para determinação do haplótipo – restrição *HincII*. a) Imagem de um gel de agarose exemplificativa de uma amplificação por PCR de um fragmento contendo o SNP rs968857 da extremidade 3' do $\psi\beta$. Canal 1: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific). Canais 2 a 5: produto de PCR de indivíduos em estudo. Canal 6: produto de PCR de um controlo positivo. Canal 7: controlo negativo b) Imagem de um gel de agarose exemplificativa dos fragmentos obtidos no ensaio de restrição com a enzima de restrição *HincII*. Canal 1: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific). Canal 2: Controlo positivo heterozigótico (AG) Canais 3 e 6: Genótipo GG. Canal 4: Genótipo AG. Canal 5: Genótipo AA. Está indicado o tamanho do fragmento de PCR e os tamanhos dos fragmentos de restrição (pb).

Após analisados os 3 polimorfismos no agrupamento génico da β -globina, compararam-se os perfis de clivagem de cada enzima para cada um dos locais polimórficos de cada indivíduo com a Figura VIII-1 do Anexo VIII e, assim, classificaram-se os indivíduos quanto ao haplótipo no agrupamento génico da β -globina.

Calculou-se a frequência de cada haplótipo e verificou-se que o haplótipo mais frequente nesta população foi o Bantu (48,1%), seguido do Senegal (32,7%) e por fim o Benim (19,2%).

Seguidamente pretendeu-se fazer um estudo de associação entre os parâmetros estudados e o haplótipo dos indivíduos. Devido à pequena dimensão da população, optou-se por trabalhar com apenas 2 grupos: indivíduos com haplótipo Senegal (em homozigotia ou heterozigotia) e indivíduos sem haplótipo Senegal (homozigotia). Utilizou-se o teste estatístico T para os parâmetros com distribuição normal, e o teste estatístico Mann-Witney, para os parâmetros com distribuição não normal (Tabela 4-2).

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) nos parâmetros hemoglobina, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, FA, RMHb e RTM entre os indivíduos com ou indivíduos sem haplótipo Senegal. Observou-se, contudo, uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos níveis de MPO entre indivíduos com e sem haplótipo Senegal. Verificou-se que a presença do haplótipo Senegal está associada com níveis mais elevados de MPO.

Tabela 4-2 - Associação entre os parâmetros estudados a presença ou ausência do haplótipo Senegal

Parâmetros	Presença do haplótipo Senegal	Ausência do haplótipo Senegal	Valor p*
Hemoglobina (g/dL)	8,86 ± 1,20 (11)	8,40 ± 1,38 (12)	0,411 ¹
HbS (%)	74,18 ± 8,19 (11)	75,42 ± 4,85 (11)	0,669 ¹
Bilirrubina (mg/dL)	1,94; 1,40-5,57 (4)	1,69; 1,26-5,46 (8)	0,461 ²
LDH (U/L)	431,00; 332-540 (4)	465,00; 328-793 (7)	0,788 ²
RDW (%)	22,76 ± 0,75 (3)	21,66 ± 2,73 (7)	0,521 ¹
Reticulócitos (%)	7,94 ± 3,47 (11)	8,17 ± 3,61 (12)	0,878 ¹
Leucócitos (células /μL)	10500; 10400-33100 (3)	10200; 7000-16800 (7)	0,383 ²
Neutrófilos (células /μL)	6513,33 ± 2130,78 (3)	4496,43 ± 1929,79 (7)	0,179 ¹
FA (μmol/g Hb/h)	365,00 ± 96,18 (4)	370,04 ± 116,19 (10)	0,940 ¹
MPO (ng/mL)	52,76 ± 20,65 (4)	31,32 ± 14,505 (10)	0,046 ¹
RMHb (μmol/g Hb/min)	21,77 ± 6,86 (4)	24,93 ± 10,60 (9)	0,599 ¹
RTM (mmol/lcel/h)	(0)	5,16 ± 1,05 (4)	--

* Valores de p <0,05 são considerados estatisticamente significativos

¹Teste T - as medidas estatísticas consideradas são: média ± desvio-padrão; (n – número de indivíduos)

²Teste Mann-Witney - as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo; (n – número de indivíduos)

-- - Valor incapaz de ser calculado

4.2.3. Pesquisa da deleção α -Talassemica – $\alpha 3,7$ e associação com os parâmetros estudados

Após realizar o procedimento experimental (Gap-PCR) para identificação da deleção de 3,7 Kb no agrupamento génico da α -globina, confirmou-se o perfil eletroforético de cada indivíduo em gel de agarose (Figura 4-5).

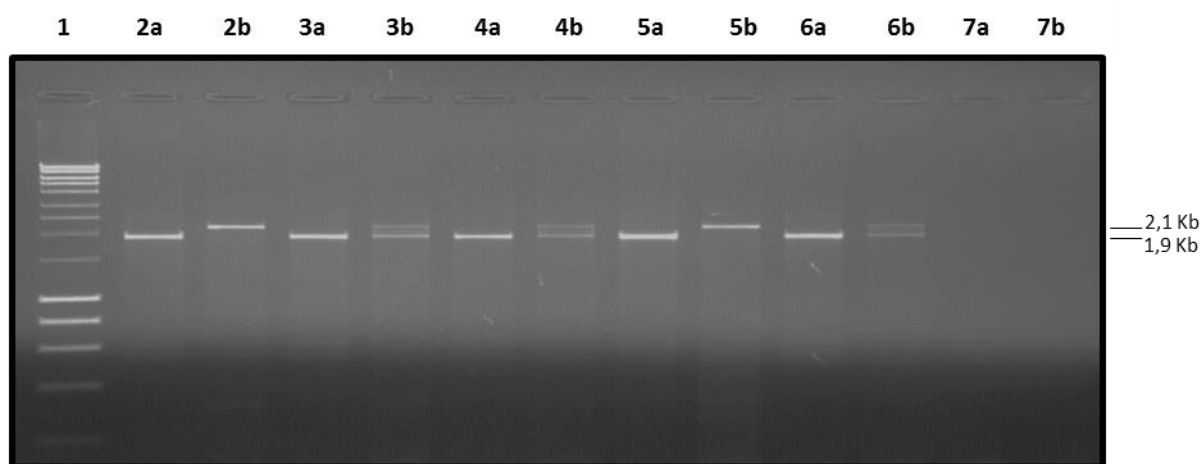


Figura 4-5 - Gel de agarose com perfil eletroforético representativo de um Gap-PCR usado para detetar a deleção de 3,7 kb. Canal 1: marcador de peso molecular *HyperLadder*, Bioline. Canais 2 (a e b) e 5 (a e b): Indivíduos homozigóticos para a não deleção. Canais 3 (a e b) e 4 (a e b): Indivíduos heterozigóticos para a deleção. Canais 6 (a e b): Controlo positivo heterozigótico. Canais 7 (a e b): controlo negativo. Está indicado o tamanho do fragmento de Gap-PCR (kb). Cada número (2 a 6) corresponde a um indivíduo diferente e as letras a e b correspondem, respetivamente, às misturas a e b referidas na Tabela VI-1 do Anexo VI.

Foi efetuado o teste do Qui-quadrado para verificar se esta população se encontrava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que se encontra em equilíbrio ($\chi^2=0,86 < 3,841_{1gl;p=0,05}$). Calcularam-se as frequências alélicas e observou-se uma frequência de 84,6 % para o alelo $\alpha\alpha$ e uma frequência de 15,4 % para o alelo com a deleção de 3,7 kb ($-\alpha 3,7$). Nesta população não foi encontrada a deleção de 3,7 kb em homozigotia.

Seguidamente pretendeu-se fazer um estudo de associação entre os parâmetros estudados e a co-herança da deleção α -talassémica $-\alpha 3,7$. Utilizou-se o teste estatístico T, para os parâmetros com distribuição normal, e o teste Mann-Whitney, para os parâmetros com distribuição não normal (Tabela 4-3).

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) nos parâmetros hemoglobina, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, MPO, RMHb e RTM entre os indivíduos entre $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e $\alpha\alpha/-\alpha 3,7$. Observou-se contudo uma diferença estatisticamente

significativa ($p < 0,05$) nos níveis de FA entre os indivíduos $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e os indivíduos $\alpha\alpha/-\alpha3,7$. Verificou-se que a co-herança da deleção α -talassêmica -3,7 está associada a níveis mais elevados de FA.

Tabela 4-3 - Associação entre os parâmetros estudados e a ausência ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) ou presença em heterozigotia da deleção α -talassêmica -3,7 ($\alpha\alpha/-\alpha3,7$)

Parâmetros	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$	Valor p*
Hemoglobina (g/dL)	8,59 \pm 1,25 (17)	8,73 \pm 1,52 (6)	0,819 ¹
HbS (%)	74,75 \pm 6,51 (16)	74,93 \pm 7,48 (6)	0,957 ¹
Bilirrubina (mg/dL)	1,88; 1,30-5,57 (9)	1,40; 1,26-2,80 (3)	0,482 ²
LDH (U/L)	432,50; 328-540 (8)	516; 411-793 (3)	0,279 ²
RDW (%)	21,60 \pm 2,16 (7)	22,90 \pm 2,91 (3)	0,450 ¹
Reticulócitos (%)	8,81 \pm 3,03 (17)	5,95 \pm 4,04 (6)	0,082 ¹
Leucócitos (células / μ L)	12300; 7000-33100 (7)	10200; 9800-10500 (3)	0,267 ²
Neutrófilos (células / μ L)	5046,43 \pm 2411,60 (7)	5230,00 \pm 1581,49 (3)	0,908 ¹
FA (μ mol/g Hb/h)	321,98 \pm 76,47 (9)	452,53 \pm 109,27 (5)	0,022 ¹
MPO (ng/mL)	41,59 \pm 19,77 (10)	27,0978 \pm 11,06269 (4)	0,199 ¹
RMHb (μ mol/g Hb/min)	22,55 \pm 10,72 (9)	27,15 \pm 5,50 (4)	0,442 ¹
RTM (mmol/lcel/h)	5,09 (1)	5,19 \pm 1,29 (3)	0,954 ¹

* Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

¹Teste T - as medidas estatísticas consideradas são: média \pm desvio-padrão (n – número de indivíduos)

²Teste Mann-Witney - as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo (n – número de indivíduos)

4.2.4. Caracterização do polimorfismo em *BCL11A* e associação com os parâmetros estudados

A presença do polimorfismo rs11886868, no gene *BCL11A*, neste estudo foi realizada por PCR-RFLP. Apresenta-se, em seguida, um resultado representativo obtido para o SNP rs11886868 (Figura 4-6).

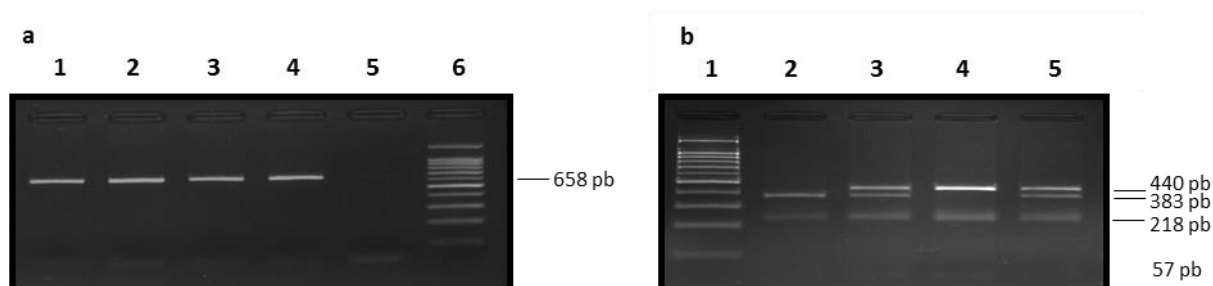


Figura 4-6 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene *BCL11A* contendo o SNP rs11886868 e b) dos fragmentos obtidos por restrição com a enzima *MbolI*. a) Imagem de um gel de agarose exemplificativa de uma amplificação por PCR de um fragmento contendo o SNP rs11886868 do gene *BCL11A*. Canais 1 a 3: produto de PCR de indivíduos em estudo. Canal 4: produto de PCR de um controlo positivo. Canal 5: controlo negativo. Canal 6: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific) b) Imagem de um gel de agarose exemplificativa dos fragmentos obtidos no ensaio de restrição com a enzima de restrição *MbolI*. Canal 1: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific). Canal 2: Genótipo CC. Canal 3: Genótipo CT. Canal 4: Genótipo TT. Canal 5: Controlo positivo heterozigótico (CT). Está indicado o tamanho do fragmento de PCR e os tamanhos dos fragmentos de restrição (pb).

Foi efetuado o teste do Qui-quadrado para verificar se esta população se encontrava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que esta se encontra em equilíbrio ($\chi^2=1,15 < 3,841_{1gl;p=0,05}$). Calcularam-se as frequências alélicas e observou-se uma frequência de 63,5% para o alelo T e uma frequência de 36,5% para o alelo C para a população em estudo. Para a população controlo (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=2:60492611-60493611;v=rs11886868;vdb=variation;vf=6846132) a frequência para o alelo T é de 73,5% e para o alelo C de 26,5%.

Foi efetuada uma análise de *Odds Ratio*, de forma a concluir se existiam diferenças significativas entre a população de doentes e a população controlo e medir a força de associação, do alelo C, o alelo mais raro (OR=2,15; IC (95%) = [0,95-4,90]; p=0,07). Os resultados não são estatisticamente significativos.

Seguidamente pretendeu-se fazer um estudo de associação entre os parâmetros estudados e os genótipos do SNP rs11886868 do gene *BCL11A*. Devido à pequena dimensão da população, optou-se por trabalhar com apenas 2 grupos: indivíduos com o genótipo TT e indivíduos com os genótipos CT

ou CC. Utilizou-se o teste estatístico T, para os parâmetros com distribuição normal, e o teste Mann-Whitney, para os parâmetros com distribuição não normal (Tabela 4-4).

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) em nenhum dos parâmetros estudados entre os genótipos TT e CT ou CC.

Tabela 4-4 - Associação entre os parâmetros estudados e os genótipos (TT e CT ou CC) do SNP rs1188686 no gene *BCL11A*

Parâmetros	TT	CT ou CC	Valor p*
Hemoglobina (g/dL)	8,56 \pm 1,49 (8)	8,66 \pm 1,23 (15)	0,866 ¹
HbS (%)	75,21 \pm 8,21 (7)	74,61 \pm 6,04 (15)	0,848 ¹
Bilirrubina (mg/dL)	1,74; 1,26-2,80 (7)	2,00; 1,39-5,57 (5)	0,343 ²
LDH (U/L)	490,50; 411-793 (6)	410; 328-490 (5)	0,082 ²
RDW (%)	21,729 \pm 2,7305 (7)	22,600 \pm 1,0440 (3)	0,616 ¹
Reticulócitos (%)	8,56 \pm 3,72 (8)	8,66 \pm 3,17 (15)	0,134 ¹
Leucócitos (células / μ L)	10500; 9800-33100 (7)	10400; 7000-16800 (3)	0,833 ²
Neutrófilos (células / μ L)	5529,29 \pm 2003,60 (7)	4103,33 \pm 2409,49 (3)	0,357 ¹
FA (μ mol/g Hb/h)	351,68 \pm 84,61 (7)	385,53 \pm 130,62 (7)	0,576 ¹
MPO (ng/mL)	39,50 \pm 18,24 (8)	34,72 \pm 20,39 (6)	0,652 ¹
RMHb (μ mol/g Hb/min)	28,05 \pm 12,18 (6)	20,46 \pm 4,86 (7)	0,156 ¹
RTM (mmol/lcel/h)	4,90 \pm 0,27 (2)	5,43 \pm 1,73 (2)	0,711 ¹

* Valores de p <0,05 são considerados estatisticamente significativos

¹Teste T - as medidas estatísticas consideradas são: média \pm desvio-padrão (n – número de indivíduos)

²Teste Mann-Witney - as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo (n – número de indivíduos)

4.2.5. Caracterização dos polimorfismos em eNOS e associação com os parâmetros estudados

A presença dos polimorfismos rs2070744, em eNOS, neste estudo foi realizada por PCR-RFLP. Apresenta-se, em seguida, um resultado representativo obtido para o SNP rs2070744 (Figura 4-7).

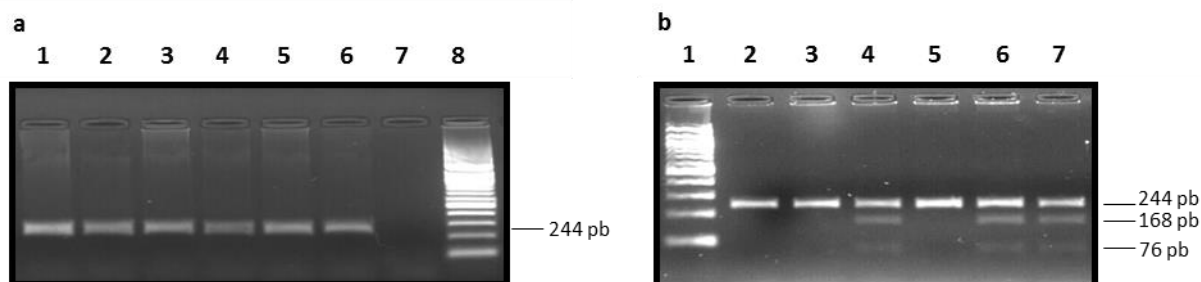


Figura 4-7 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene eNOS contendo o SNP rs2070744 e b) dos fragmentos obtidos por restrição com a enzima NaeI. a) Imagem de um gel de agarose exemplificativa de uma amplificação por PCR de um fragmento contendo o SNP rs2070744 do gene eNOS. Canais 1 a 5: produto de PCR de indivíduos em estudo. Canal 6: produto de PCR de um controlo positivo. Canal 7: controlo negativo. Canal 8: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific) b) Imagem de um gel de agarose exemplificativa dos fragmentos obtidos no ensaio de restrição com a enzima de restrição NaeI. Canal 1: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific). Canais 2, 3 e 5: Genótipo TT. Canais 4 e 6: Genótipo CT. Canal 7: Controlo positivo heterozigótico (CT). Está indicado o tamanho do fragmento de PCR e os tamanhos dos fragmentos de restrição (pb).

Foi efetuado o teste do Qui-quadrado para verificar se esta população se encontrava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que esta se encontra em equilíbrio ($\chi^2=2,34 < 3,841_{1gl;p=0,05}$). Calcularam-se as frequências alélicas e observou-se uma frequência de 76,9% para o alelo T e 23,1% para o alelo C para a população em estudo. Na genotipagem deste SNP não se encontrou o alelo mais raro (alelo C) em homozigotia. Para a população controlo (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:150992491-150993491;v=rs2070744;vdb=variation;vf=102617269) a frequência para o alelo T é de 86,2% e para o alelo C de 13,8%.

Foi efetuada uma análise de *Odds Ratio*, de forma a concluir se existiam diferenças significativas entre a população de doentes e a população controlo e medir a força de associação, do alelo C, o alelo mais raro (OR = 2,48; IC (95%) = [1,12-5,46]; p = 0,02). Os resultados são estatisticamente significativos e a associação sugere que a presença do alelo C (genótipo CC ou CT) nos doentes é maior do que na população controlo.

Seguidamente pretendeu-se fazer um estudo de associação entre os parâmetros estudados e os genótipos do SNP rs2070744 em eNOS. Utilizou-se o teste estatístico T, para os parâmetros com distribuição normal, e o teste Mann-Whitney, para os parâmetros com distribuição não normal (Tabela 4-5).

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) nos parâmetros hemoglobina, HbS, bilirrubina, RDW, leucócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM entre os genótipos TT e CT. Observaram-se, contudo, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos níveis de LDH e reticulócitos entre os genótipos TT e CT. Verificou-se que a presença do genótipo TT está associada a níveis mais elevados de LDH e de reticulócitos.

Tabela 4-5 - Associação entre os parâmetros estudados e os genótipos (TT e CT) do SNP rs2070744 no gene *eNOS*

Parâmetros	TT	CT	Valor p*
Hemoglobina (g/dL)	8,23 \pm 1,20 (13)	9,14 \pm 1,28 (10)	0,095 ¹
HbS (%)	76,26 \pm 6,08 (12)	73,06 \pm 7,11 (10)	0,268 ¹
Bilirrubina (mg/dL)	1,74; 1,26-2,80 (7)	2,00; 1,30-5,57 (5)	0,530 ²
LDH (U/L)	490,00; 410-793 (7)	371,50; 328-451 (4)	0,042 ²
RDW (%)	22,53 \pm 1,93 (7)	20,733 \pm 3,1182 (3)	0,288 ¹
Reticulócitos (%)	9,56 \pm 3,43 (13)	6,12 \pm 2,50 (10)	0,015 ¹
Leucócitos (células / μ L)	12300; 7000-33100 (7)	10400,00; 10200-10500 (3)	0,667 ²
Neutrófilos (células / μ L)	5287,86 \pm 2339,76 (7)	4666,67 \pm 1776,30 (3)	0,695 ¹
FA (μ mol/g Hb/h)	357,26 \pm 57,00 (7)	379,95 \pm 146,08 (7)	0,712 ¹
MPO (ng/mL)	38,98 \pm 20,17 (8)	35,40 \pm 17,86 (6)	0,737 ¹
RMHb (μ mol/g Hb/min)	27,39 \pm 12,13 (6)	21,019 \pm 5,797 (7)	0,240 ¹
RTM (mmol/lcel/h)	4,90 \pm 0,27 (2)	5,43 \pm 1,73 (2)	0,711 ¹

* Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

¹Teste T - as medidas estatísticas consideradas são: média \pm desvio-padrão (n – número de indivíduos)

²Teste Mann-Witney - as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo (n – número de indivíduos)

A presença dos polimorfismos rs1799983, em *eNOS*, neste estudo foi realizada por PCR-RFLP. Apresenta-se, em seguida, um resultado representativo obtido para o SNP rs1799983 (Figura 4-8).

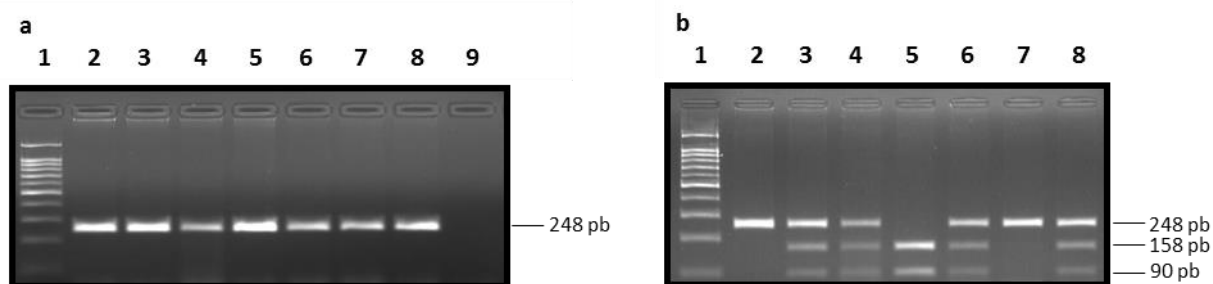


Figura 4-8 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene *eNOS* contendo o SNP rs1799983 e b) dos fragmentos obtidos por restrição com a enzima *Mbol*. a) Imagem de um gel de agarose exemplificativa de uma amplificação por PCR de um fragmento contendo o SNP rs1799983 do gene *eNOS*. Canal 1: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific). Canais 2 a 7: produto de PCR de indivíduos em estudo. Canal 8: produto de PCR de um controlo positivo. Canal 9: controlo negativo b) Imagem de um gel de agarose exemplificativa dos fragmentos obtidos no ensaio de restrição com a enzima de restrição *Mbol*. Canal 1: marcador de peso molecular 100 pb (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific). Canais 2 e 7: Genótipo GG. Canais 3, 4 e 6: Genótipo GT. Canal 5: Genótipo TT. Canal 8: Controlo positivo heterozigótico (GT). Está indicado o tamanho do fragmento de PCR e os tamanhos dos fragmentos de restrição (pb).

Foi efetuado o teste do Qui-quadrado para verificar se esta população se encontrava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que esta se encontra em equilíbrio ($\chi^2=0,01 < 3,841_{1gl;p=0,05}$). Calcularam-se as frequências alélicas e observou-se uma frequência de 82,7% para o alelo G e 17,3% para o alelo T para a população em estudo. Para a população controlo (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:150998523-150999523;v=rs1799983;vdb=variation;vf=102374312) a frequência para o alelo G é de 93,0% e para o alelo T de 7,0%.

Foi efetuada uma análise de *Odds Ratio*, de forma a concluir se existiam diferenças significativas entre a população de doentes e a população controlo e medir a força de associação, do alelo T, o alelo mais raro (OR= 2,89; IC (95%) = [1,22-6,86]; p = 0,015). Os resultados são estatisticamente significativos e a associação sugere que a presença do alelo T (genótipo TT ou GT) nos doentes é maior do que na população controlo.

Seguidamente pretendeu-se fazer um estudo de associação entre os parâmetros estudados e os genótipos do SNP rs1799983 em *eNOS*. Devido à pequena dimensão da população, optou-se por trabalhar com apenas 2 grupos: indivíduos com o genótipo GG e indivíduos com os genótipos GT ou TT. Utilizou-se o teste estatístico T, para os parâmetros com distribuição normal, e o teste Mann-Whitney, para os parâmetros com distribuição não normal (Tabela 4-6).

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) nos parâmetros hemoglobina, HbS, bilirrubina, RDW, leucócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM entre os genótipos GG e GT ou TT. Observaram-se, contudo, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos níveis de LDH e reticulócitos entre os genótipos GG e GT ou TT. Verificou-se que a presença do genótipo GG está associada a níveis mais elevados de LDH e de reticulócitos.

Tabela 4-6 - Associação entre os parâmetros estudados e os genótipos (GG e GT ou TT) do SNP rs1799983 no gene *eNOS*

Parâmetros	GG	GT ou TT	Valor p*
Hemoglobina (g/dL)	8,46 \pm 1,18 (17)	9,02 \pm 1,77 (5)	0,412 ¹
HbS (%)	75,04 \pm 6,40 (16)	76,46 \pm 5,99 (5)	0,665 ¹
Bilirrubina (mg/dL)	1,70; 1,26-2,80 (8)	3,73; 1,40-5,57 (4)	0,154 ²
LDH (U/L)	490,00; 410-793 (7)	371,50; 328-451 (4)	0,042 ²
RDW (%)	21,86 \pm 2,59 (8)	22,50 \pm 0,8485 (2)	0,750 ¹
Reticulócitos (%)	9,20 \pm 3,21 (17)	4,53 \pm 1,75 (5)	0,006 ¹
Leucócitos (células / μ L)	11250; 7000-33100 (8)	10450; 10400-10500 (2)	1,00 ²
Neutrófilos (células / μ L)	5010,63 \pm 2303,76 (8)	5465,00 \pm 1576,85 (2)	0,803 ¹
FA (μ mol/g Hb/h)	339,82 \pm 72,23 (8)	438,45 \pm 130,03 (5)	0,103 ¹
MPO (ng/mL)	40,09 \pm 19,16 (9)	32,69 \pm 18,53 (5)	0,498 ¹
RMHb (μ mol/g Hb/min)	26,04 \pm 11,64 (7)	23,36 \pm 4,7533 (5)	0,640 ¹
RTM (mmol/lcel/h)	4,90 \pm 0,27 (2)	5,43 \pm 1,78 (2)	0,711 ¹

* Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

¹Teste T - as medidas estatísticas consideradas são: média \pm desvio-padrão (n – número de indivíduos)

²Teste Mann-Witney - as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo (n – número de indivíduos)

A análise do polimorfismo no intrão 4 do gene *eNOS* foi realizado por PCR. Apresenta-se em seguida um resultado representativo obtido para o VNTR (Figura 4-9).

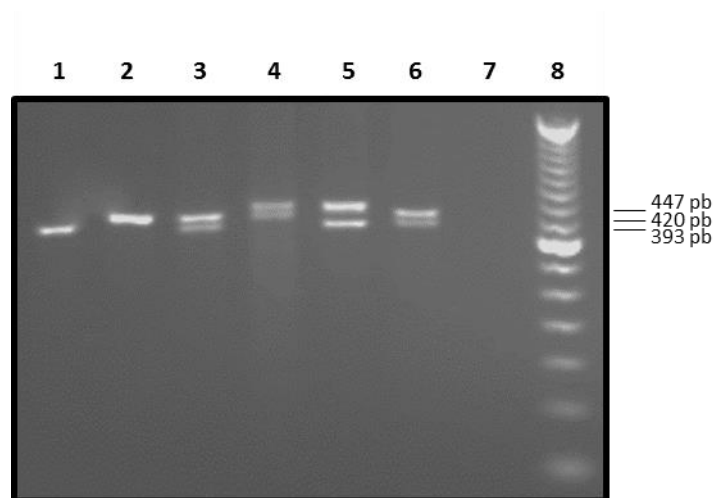


Figura 4-9 – Gel de agarose com perfil eletroforético representativo de uma amplificação região genômica contendo o VNTR do intrão 4 do gene *eNOS*. Canal 1: Genótipo 4a/4a. Canal 2: Genótipo 4b/4b. Canal 3: Genótipo 4a/4b. Canal 4: Genótipo 4b/4c. Canal 5: Genótipo 4a/4c. Canal 6: Controle heterozigótico positivo (4a/4b). Canal 7: controle negativo. Canal 8: marcador de peso molecular 50 pb (*50 bp DNA Ladder*, Invitrogen). Está indicado o tamanho do fragmento de PCR (pb).

Foi efetuado o teste do Qui-quadrado para verificar se esta população se encontrava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que esta se encontra em equilíbrio ($\chi^2=0,26 < 7,815_{3gl;p=0,05}$). Calcularam-se as frequências alélicas e observou-se uma frequência para o alelo 4a de 34,6% e para o alelo 4b de 61,5% para a população em estudo. Ainda foi observada uma frequência de 3,8% para uma variante rara (o alelo 4c).

Seguidamente pretendeu-se fazer um estudo de associação entre os parâmetros estudados e os genótipos do VNTR do intrão 4 em *eNOS*. Para isso, devido à pequena dimensão da população, optou-se por dividir a amostra em 2 grupos: indivíduos com a presença do alelo 4a (em homozigotia ou heterozigotia) e indivíduos sem a presença deste alelo. Utilizou-se o teste estatístico T, para os parâmetros com distribuição normal, e o teste Mann-Witney, para os parâmetros com distribuição não normal (Tabela 4-7).

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) nos parâmetros hemoglobina, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos, FA, MPO, RMHb e RTM entre indivíduos com a presença ou a ausência do alelo 4a. Observou-se, contudo, uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos níveis de neutrófilos entre indivíduos com a presença ou a ausência do alelo 4a. Verificou-se que a presença do alelo 4a está associada a níveis mais elevados de neutrófilos.

Tabela 4-7 - Associação entre os parâmetros estudados e a presença ou ausência do alelo 4a do VNTR do intrão 4 no gene *eNOS*

Parâmetros	Presença do alelo 4a	Ausência do alelo 4a	Valor p*
Hemoglobina (g/dL)	8,26 ± 1,01 (13)	9,10 ± 1,51 (10)	0,125 ¹
HbS (%)	76,16 ± 6,58 (12)	73,18 ± 6,59 (10)	0,304 ¹
Bilirrubina (mg/dL)	1,74; 1,30-2,80 (7)	2,00; 1,26-5,57 (5)	0,530 ²
LDH (U/L)	477,5, 411-793 (6)	410,00; 328-516 (5)	0,126 ²
RDW (%)	22,28 ± 2,69 (7)	21,30 ± 1,21 (3)	0,570 ¹
Reticulócitos (%)	8,68 ± 3,50 (13)	7,27 ± 3,43 (10)	0,346 ¹
Leucócitos (células / μ L)	12300; 9800-33100 (7)	10200; 7000-10400 (3)	0,117 ²
Neutrófilos (células / μ L)	5942,14 ± 1800,85 (7)	3140,00 ± 1417,78 (3)	0,045 ¹
FA (μ mol/g Hb/h)	377,90 ± 122,59 (8)	356,20 ± 92,20 (6)	0,723 ¹
MPO (ng/mL)	40,43 ± 20,06 (9)	32,07 ± 16,14 (5)	0,442 ¹
RMHb (μ mol/g Hb/min)	25,88 ± 11,08 (8)	20,88 ± 5,73 (5)	0,375 ¹
RTM (mmol/lcel/h)	4,64 ± 0,62 (2)	5,68 ± 1,37 (2)	0,436 ¹

* Valores de p <0,05 são considerados estatisticamente significativos

¹Teste T - as medidas estatísticas consideradas são: média ± desvio-padrão; (n – número de indivíduos)

²Teste Mann-Witney - as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo; (n – número de indivíduos)

4.2.6. Caracterização de polimorfismos em *HMOX-1* e associação com os parâmetros estudados

A presença do polimorfismo rs2071746 em *HMOX-1* neste estudo foi realizada por PCR alelo-específico. Apresenta-se, em seguida, um resultado representativo obtido para o SNP rs2071746 (Figura 4-10).

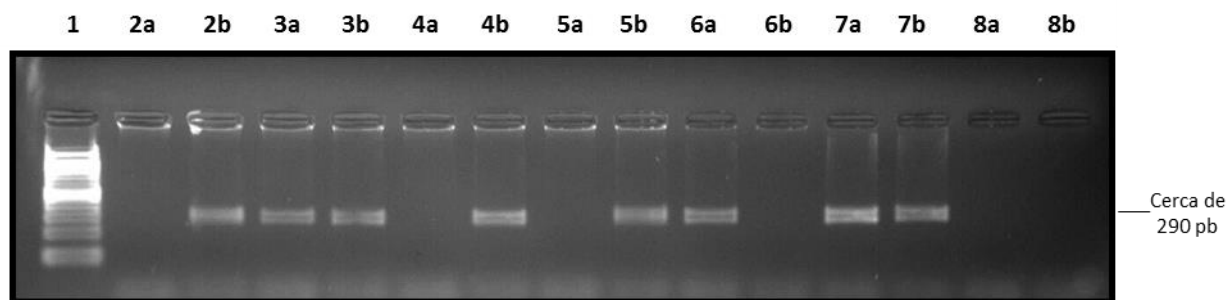


Figura 4-10 - Gel de agarose com perfil eletroforético representativo de um PCR alelo-específico usado para detectar rs2071746 amplificado no gene *HMOX-1*. Canal 1: marcador de peso molecular 100bp (*DNA ladder 100bp plus*, Thermo Scientific). Canais 2 (a e b), 4 (a e b) e 5 (a e b): Genótipo TT. Canais 3 (a e b): Genótipo AT. Canais 6 (a e b): Genótipo AA. Canais 7 (a e b): controlo positivo heterozigótico (AT). Canais 8 (a e b): controlo negativo. Está indicado o tamanho do fragmento de PCR alelo-específico (pb). Cada número (2 a 7) corresponde a um indivíduo diferente e as letras a e b correspondem, respetivamente, às misturas a e b referidas na Tabela VII-1 do Anexo VII.

Foi efetuado o teste do Qui-quadrado para verificar se esta população se encontrava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que esta se encontra em equilíbrio ($\chi^2=0,746 < 3,841_{1gl;p=0,05}$). Calcularam-se as frequências alélicas e observou-se uma frequência de 44,2% para o alelo A e 55,8% para o alelo T para a população em estudo. Para a população controlo (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=22:35380179-35381179;v=rs2071746;vdb=variation;vf=1386081) a frequência para o alelo A é de 31,2% e para o alelo T é de 68,8%.

Foi efetuada uma análise de *Odds Ratio*, de forma a concluir se existiam diferenças significativas entre a população de doentes e a população controlo e medir a força de associação do alelo A, o alelo mais raro (OR=2,44; IC (95%) = [1,01-5,89]; p = 0,047). Os resultados são estatisticamente significativos e a associação sugere que a presença do alelo A nos doentes é maior do que na população controlo.

Seguidamente pretendeu-se fazer um estudo de associação entre os parâmetros estudados e os genótipos do rs2071746 em *HMOX-1*. Utilizou-se o teste estatístico ANOVA, para os parâmetros com

distribuição normal e o teste Kruskal-Wallis, para os parâmetros com distribuição não normal (Tabela 4-8).

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) em nenhum dos parâmetros estudados entre os 3 genótipos.

Tabela 4-8 - Associação entre os parâmetros estudados e os genótipos (AA, AT e TT) do SNP rs2071746 no gene *HMOX-1*

Parâmetros	AA	AT	TT	Valor p*
Hemoglobina (g/dL)	9,90 \pm 1,65 (3)	8,12 \pm 0,98 (13)	9,02 \pm 1,31 (7)	0,052 ¹
HbS (%)	72,70 \pm 6,85 (3)	77,15 \pm 6,92 (12)	71,67 \pm 4,95 (7)	0,187 ¹
Bilirrubina (mg/dL)	2,00 (1)	1,74; 1,30-5,57 (7)	1,64; 1,26-2,42 (4)	0,674 ²
LDH (U/L)	332 (1)	432,50; 328-793 (6)	490,50; 411-540 (4)	0,311 ²
RDW (%)	21,90 (1)	21,94 \pm 3,21 (5)	22,07 \pm 1,56 (4)	0,996 ¹
Reticulócitos (%)	7,15 \pm 3,35 (3)	8,84 \pm 3,45 (13)	7,01 \pm 3,67 (7)	0,490 ¹
Leucócitos (células / μ L)	10400 (1)	10200; 7000-16800 (5)	11400; 10200-33100 (4)	0,627 ²
Neutrófilos (células / μ L)	4350 (1)	4209,00 \pm 1933,11 (5)	6405,00 \pm 2135,11 (4)	0,311 ¹
FA (μ mol/g Hb/h)	481,24 \pm 175,63 (2)	338,84 \pm 96,11 (8)	371,82 \pm 84,27 (4)	0,259 ¹
MPO (ng/mL)	23,04 \pm 12,59 (2)	38,10 \pm 16,78 (8)	43,34 \pm 24,48 (4)	0,482 ¹
RMHb (μ mol/g Hb/min)	21,57 \pm 0,48 (2)	21,66 \pm 6,34 (8)	31,67 \pm 16,66 (3)	0,295 ¹
RTM (mmol/lcel/h)	4,20 (1)	5,87 \pm 1,10 (2)	4,71 (1)	0,603 ¹

* Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

¹Teste ANOVA - as medidas estatísticas consideradas são: média \pm desvio-padrão (n – número de indivíduos)

²Teste Kruskal-Wallis - as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo (n – número de indivíduos)

A presença da variação em número do tipo *Short Tandem Repeat* (GT)_n, rs3074372, em *HMOX-1* neste estudo foi realizada por GeneScan. Apresentam-se em seguida resultados representativos correspondentes aos diferentes tipos de alelos encontrados (S, M e L) (Figura 4-11).

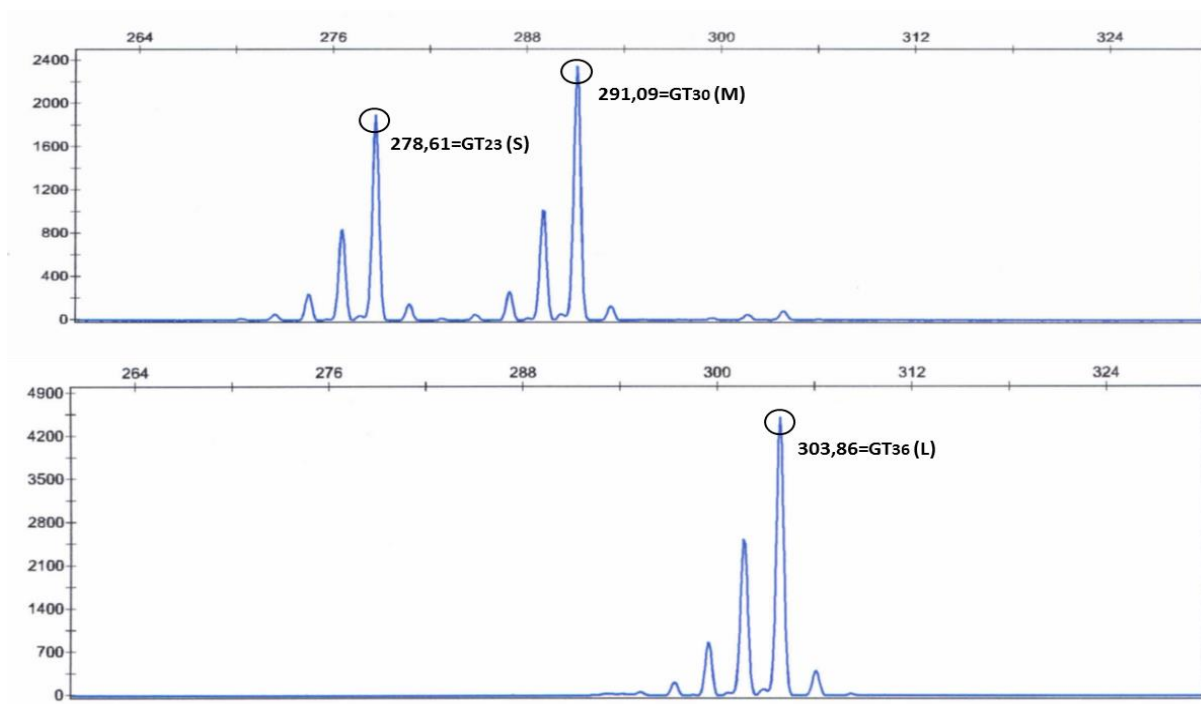


Figura 4-11- Imagem representativa de eletroferogramas obtidos por GeneScan mostrando fragmentos do STR rs3074372 no gene *HMOX-1*, representativos dos três tipos de classes de alelos: S, M e L. No eixo x a escala está em pares de bases e no eixo y em unidades relativas de fluorescência.

Foi efetuado o teste do Qui-quadrado para verificar se esta população se encontrava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que esta se encontra em equilíbrio ($\chi^2=3,98 < 7,815_{3gl;p=0,05}$). Calcularam-se as frequências alélicas e observou-se uma frequência para o alelo S de 19,2%, para o alelo M de 59,6% e para o alelo L de 21,2% para a população em estudo.

Seguidamente pretendeu-se fazer um estudo de associação entre os parâmetros estudados e os genótipos do STR rs3074372, em *HMOX-1*. Devido à pequena dimensão da população, optou-se por trabalhar com apenas 2 grupos: indivíduos com presença do alelo L (em homozigotia ou heterozigotia) e indivíduos com ausência do alelo L. Utilizou-se o teste estatístico T, para os parâmetros com distribuição normal, e o teste Mann-Witney, para os parâmetros com distribuição não normal (Tabela 4-9).

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) em nenhum dos parâmetros estudados entre a presença e a ausência do alelo L.

Tabela 4-9 - Associação entre os parâmetros estudados e a presença ou ausência do alelo L do STR rs3074372 no gene *HMOX-1*

Parâmetros	Presença do alelo L	Ausência do alelo L	Valor p*
Hemoglobina (g/dL)	8,91 \pm 1,31 (8)	8,47 \pm 1,29 (15)	0,450 ¹
HbS (%)	74,48 \pm 7,72 (8)	74,98 \pm 6,18 (14)	0,807 ¹
Bilirrubina (mg/dL)	1,76; 1,26-5,46 (6)	1,87; 1,39-5,57 (6)	0,699 ²
LDH	516,00; 328-793 (5)	432,50; 332-490 (6)	0,537 ²
RDW	21,64 \pm 3,24 (5)	22,34 \pm 1,12 (5)	0,661 ¹
Reticulócitos	7,10 \pm 2,83 (8)	8,57 \pm 3,75 (15)	0,345 ¹
Leucócitos	10200; 7000-33100 (5)	12300; 10400-16800 (5)	0,151 ²
Neutrófilos	4474,00 \pm 2726,46 (5)	5729,00 \pm 1254,56 (5)	0,377 ¹
FA (μ mol/g Hb/h)	346,73 \pm 94,59 (7)	390,47 \pm 121,75 (7)	0,467 ¹
MPO (ng/mL)	35,48 \pm 21,41 (7)	39,41 \pm 16,73 (7)	0,708 ¹
RMHb (μ mol/g Hb/min)	21,55 \pm 7,69 (6)	26,02 \pm 10,86 (7)	0,419 ¹
RTM (mmol/lcel/h)	5,68 \pm 1,37 (2)	4,64 \pm 0,62 (2)	0,436 ¹

* Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

¹Teste T - as medidas estatísticas consideradas são: média \pm desvio-padrão; (n – número de indivíduos)

²Teste Mann-Witney - as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo; (n – número de indivíduos)

4.2.7. Caracterização do polimorfismo do gene *MTHFR* e associação com os parâmetros estudados

A presença do polimorfismo rs1801133 em *MTHFR* neste estudo foi realizada por PCR-RFLP. Apresenta-se, em seguida, um resultado representativo obtido para o SNP rs1801133 (Figura 4-12).

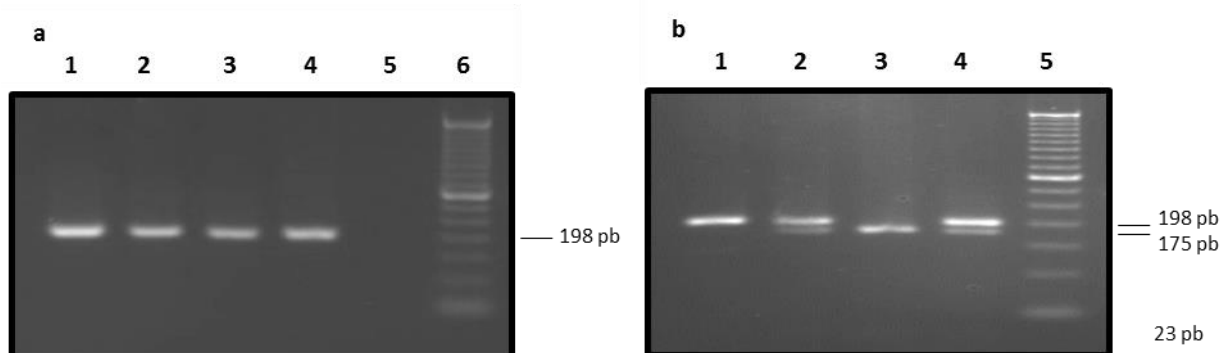


Figura 4-12 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene *MTHFR* contendo o SNP rs1801133 e b) dos fragmentos obtidos por restrição com a enzima *HinfI*. a) Imagem de um gel de agarose exemplificativa de uma amplificação por PCR de um fragmento contendo o SNP rs1801133 do gene *MTHFR*. Canais 1 a 3: produto de PCR de indivíduos em estudo. Canal 4: produto de PCR de um controlo positivo. Canal 5: controlo negativo. Canal 6: marcador de peso molecular 50 pb (*50 bp DNA Ladder*, Invitrogen) b) Imagem de um gel de agarose exemplificativa dos fragmentos obtidos no ensaio de restrição com a enzima de restrição *HinfI*. Canal 1: Genótipo CC. Canal 2: Genótipo CT. Canal 3: Genótipo TT. Canal 4: Controlo positivo heterozigótico (CT). Canal 5: marcador de peso molecular 50 pb (*50 bp DNA Ladder*, Invitrogen). Está indicado o tamanho do fragmento de PCR e os tamanhos dos fragmentos de restrição (pb).

Foi efetuado o teste do Qui-quadrado para verificar se esta população se encontrava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que esta se encontra em equilíbrio ($\chi^2=0,002 < 3,841_{1gl;p=0,05}$). Calcularam-se as frequências alélicas e observou-se uma frequência de 80,8% para o alelo C e 19,2% para o alelo T para a população em estudo. Para a população controlo (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:11795821-11796821;v=rs1801133;vdb=variation;vf=102375326) a frequência para o alelo C é de 91,0% e para o alelo T é de 9,0%.

Foi efetuada uma análise de *Odds Ratio*, de forma a concluir se existiam diferenças significativas entre a população de doentes e a população controlo e medir a força de associação, do alelo T, o alelo mais raro (OR=2,60; IC (95%) = [1,13-5,97]; $p = 0,02$). Os resultados são estatisticamente significativos e a associação sugere que a presença do alelo T nos doentes é maior do que na população controlo.

Seguidamente pretendeu-se fazer um estudo de associação entre os parâmetros estudados e os genótipos do rs1801133 em *MTHFR*. Devido à pequena dimensão da população, optou-se por

trabalhar com apenas 2 grupos: indivíduos com o genótipo CC e indivíduos com os genótipos CT ou TT. Utilizou-se o teste estatístico T, para os parâmetros com distribuição normal e o teste Mann-Witney, para os parâmetros com distribuição não normal (Tabela 4-10).

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) em nenhum dos parâmetros estudados entre os genótipos CC e CT ou TT.

Tabela 4-10 - Associação entre os parâmetros estudados e os genótipos (CC e CT ou TT) do SNP rs1801133 no gene *MTHFR*

Parâmetros	CC	CT ou TT	Valor p*
Hemoglobina (g/dL)	8,41 \pm 1,48 (15)	9,02 \pm 0,78 (8)	0,290 ¹
HbS (%)	76,12 \pm 6,48 (15)	71,98 \pm 6,41 (7)	0,177 ¹
Bilirrubina (mg/dL)	1,88; 1,26-5,57 (9)	1,74; 1,30-5,46 (3)	1,00 ²
LDH (U/L)	465; 332-793 (9)	371; 328-414 (2)	0,218 ²
RDW (%)	22,72 \pm 1,69 (8)	19,05 \pm 2,61 (2)	0,274 ¹
Reticulócitos (%)	7,30 \pm 3,43 (15)	9,49 \pm 3,27 (8)	0,153 ¹
Leucócitos (células / μ L)	10450; 7000-33100 (8)	13150; 10200-16100 (2)	1,00 ²
Neutrófilos (células / μ L)	5443,75 \pm 2216,97 (8)	3732,50 \pm 936,91 (2)	0,333 ¹
FA (μ mol/g Hb/h)	369,10 \pm 78,56 (10)	367,34 \pm 176,79 (4)	0,979 ¹
MPO (ng/mL)	40,22 \pm 19,12 (10)	30,50 \pm 17,56 (4)	0,389 ¹
RMHb (μ mol/g Hb/min)	26,33 \pm 10,24 (9)	18,63 \pm 4,65 (4)	0,185 ¹
RTM (mmol/lcel/h)	5,68 \pm 1,37 (2)	4,64 \pm 0,62 (2)	0,436 ¹

* Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

¹Teste T - as medidas estatísticas consideradas são: média \pm desvio-padrão; (n – número de indivíduos)

²Teste Mann-Witney - as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo; (n – número de indivíduos)

4.2.8. Caracterização do polimorfismo do gene *MPO* e associação com os parâmetros estudados

A presença do polimorfismo rs2333227 no gene *MPO* neste estudo foi realizada por PCR-RFLP. Apresenta-se, em seguida, um resultado representativo obtido para o SNP rs2333227 (Figura 4-13).

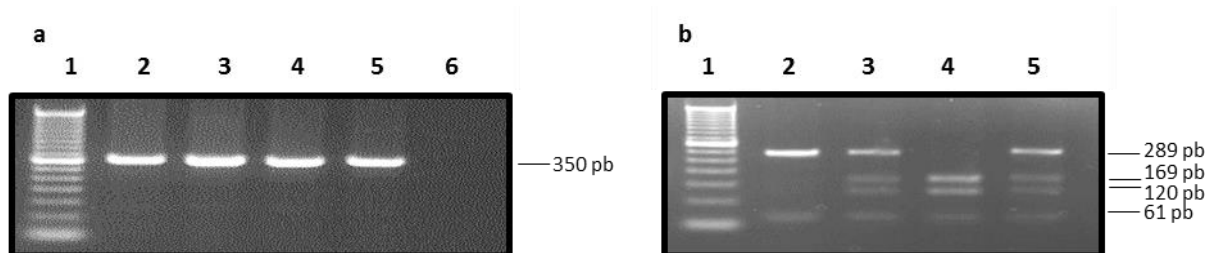


Figura 4-13 - Géis de agarose com perfil eletroforético a) da amplificação da região do gene *MPO* contendo o SNP rs2333227 e b) dos fragmentos obtidos por restrição com a enzima *Acil*. a) Imagem de um gel de agarose exemplificativa de uma amplificação por PCR de um fragmento contendo o SNP rs2333227 do gene *MPO*. Canal 1: marcador de peso molecular 50 pb (*50 bp DNA Ladder*, Invitrogen). Canais 2 a 4: produto de PCR de indivíduos em estudo. Canal 5: produto de PCR de um controlo positivo. Canal 6: controlo negativo b) Imagem de um gel de agarose exemplificativa dos fragmentos obtidos no ensaio de restrição com a enzima de restrição *Acil*. Canal 1: marcador de peso molecular 50 pb (*50 bp DNA Ladder*, Invitrogen). Canal 2: Genótipo AA. Canal 3: Genótipo AG. Canal 4: Genótipo GG. Canal 5: Controlo positivo heterozigótico (AG). Está indicado o tamanho do fragmento de PCR e os tamanhos dos fragmentos de restrição (pb).

Foi efetuado o teste do Qui-quadrado para verificar se esta população se encontrava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que esta se encontra em equilíbrio ($\chi^2=3,331 < 3,841_{1gl;p=0,05}$). Calcularam-se as frequências alélicas e observou-se uma frequência de 40,3% para o alelo A e 59,7% para o alelo G para a população em estudo. Para a população controlo (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=17:58280901-58281901;v=rs2333227;vdb=variation;vf=102847434) a frequência para o alelo A é de 36,5% e para o alelo G é de 63,5%.

Foi efetuada uma análise de *Odds Ratio*, de forma a concluir se existiam diferenças significativas entre a população de doentes e a população controlo e medir a força de associação do alelo A, o alelo mais raro (OR=1,92; IC (95%) = [0.80-4,63]; p=0,15). Os resultados não são estatisticamente significativos.

Seguidamente pretendeu-se fazer um estudo de associação entre os parâmetros estudados e os genótipos do rs2333227 no gene *MPO*. Devido à pequena dimensão da população, optou-se por trabalhar com apenas 2 grupos: indivíduos com o genótipo GG e indivíduos com os genótipos AG ou AA. Utilizou-se o teste estatístico T, para os parâmetros com distribuição normal, e o teste Mann-Witney, para os parâmetros com distribuição não normal (Tabela 4-11).

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) em nenhum dos parâmetros estudados entre os genótipos GG e AG ou AA.

Tabela 4-11 - Associação entre os parâmetros estudados e os genótipos (GG e AG ou AA) do SNP rs2333227 no gene *MPO*

Parâmetros	GG	AG ou AA	Valor p*
Hemoglobina (g/dL)	8,71 \pm 1,06 (7)	8,59 \pm 1,41 (16)	0,834 ¹
HbS (%)	71,07 \pm 6,86 (7)	76,54 \pm 5,92 (15)	0,069 ¹
Bilirrubina (mg/dL)	3,94; 2,42-5,46 (2)	1,69; 1,26-5,57 (10)	0,182 ²
LDH	396,50; 328-465 (2)	451,00; 332-793 (9)	0,436 ²
RDW	22,00 (1)	21,98 \pm 2,46 (9)	0,997 ¹
Reticulócitos	9,43 \pm 3,30 (7)	7,464 \pm 3,46 (16)	0,219 ¹
Leucócitos	12300 (1)	10400; 7000-33100 (9)	0,800 ²
Neutrófilos	6940 (1)	4897,22 \pm 2127,56 (9)	0,389 ¹
FA (μ mol/g Hb/h)	283,38 \pm 47,67 (2)	382,81 \pm 108,75 (12)	0,239 ¹
MPO (ng/mL)	22,04 \pm 7,25 (2)	40,02 \pm 18,78 (12)	0,218 ¹
RMHb (μ mol/g Hb/min)	30,47 \pm 25,56 (2)	22,77 \pm 5,61 (11)	0,744 ¹
RTM (mmol/lcel/h)	(0)	5,16 \pm 1,05 (4)	--

* Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

¹Teste T - as medidas estatísticas consideradas são: média \pm desvio-padrão; (n – número de indivíduos)

²Teste Mann-Witney - as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo; (n – número de indivíduos)

-- - Valor incapaz de ser calculado

4.3. Determinações bioquímicas

Inicialmente, estudou-se a normalidade das variáveis MPO, FA, RMHb e RTM para a população de doentes com anemia das células falciformes e para os grupos controlo (Tabela 4-12). Para a MPO observou-se que a população dos doentes apresentava distribuição normal e a controlo não apresentava distribuição normal. Como uma das populações apresentava distribuição não normal optou-se por efetuar o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Quanto à FA, RMHb e RTM observou-se que as populações de doentes e controlos apresentavam uma distribuição normal, efetuando-se, assim, o teste paramétrico T.

Tabela 4-12 - Estatística descritiva dos FA, MPO, RMHb e RTM na população de doentes e nas populações controlo e teste de normalidade Shapiro-Wilk

Parâmetros	Populações	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Valor p* (Teste de normalidade Shapiro-Wilk)
MPO (ng/mL)	Doentes	14	37,45	29,56	14,14	78,63	18,58	0,162
	Controlos	34	23,29	13,00	3,10	152,60	33,38	0,000
FA (μ mol/g Hb/h)	Doentes	14	368,61	347,10	217,74	605,44	107,10	0,585
	Controlos	47	321,18	281,64	52,04	774,45	158,40	0,095
RMHb (μ mol/g Hb/min)	Doentes	13	23,96	21,90	12,40	48,55	9,44	0,071
	Controlos	41	22,40	23,69	1,74	46,34	8,02	0,403
RTM (mmol/lcel/h)	Doentes	4	5,17	4,90	4,21	6,65	1,05	0,485
	Controlos	47	3,96	3,90	0,64	6,82	1,34	0,635

*Considera-se a distribuição normal quando $p \geq 0,05$

4.3.1. Determinação da concentração da mieloperoxidase

Para fazer a comparação da concentração da MPO entre as populações doentes e controlos, e perceber se existiam diferenças estatisticamente significativas entre estas, efetuou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney. Os resultados obtidos demonstram diferenças estatisticamente significativas na concentração de MPO entre os doentes e o grupo controlo ($p=0,000$), nos quais os doentes apresentam valores mais elevados de MPO (Tabela 4-13).

Tabela 4-13 - Concentração da MPO para a população de doentes com anemia das células falciformes e o grupo controlo

MPO (ng/mL)					
	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor p*
Doentes	14	29,56	14,14	78,63	0,000
Controlos	34	13,00	3,10	152,60	

*Nível de significância do teste Mann-Whitney é de 0,05

4.3.2. Caracterização dos fenótipos da haptoglobina

Determinaram-se os fenótipos da haptoglobina a partir dos plasmas de 15 doentes com anemia das células falciformes. Destes, 13 indivíduos apresentavam o fenótipo Hp1-1 e 2 indivíduos o fenótipo Hp0. Devido a estes resultados não se procedeu para a análise estatística.

4.3.3. Determinação da atividade da fosfatase ácida

Para fazer a comparação da concentração da FA entre as populações de doentes e controlos, e perceber se existiam diferenças estatisticamente significativas entre estas, efetuou-se o teste paramétrico T. Os resultados obtidos demonstram que não existem diferenças estatisticamente significativas na concentração de FA entre os doentes e o grupo controlo ($p=0,299$) (Tabela 4-14).

Tabela 4-14 - Atividade da FA para a população de doentes com anemia das células falciformes e o grupo controlo

FA ($\mu\text{mol/g Hb/h}$)				
	N	Média	Desvio-padrão	Valor p*
Doentes	14	368,61	107,1	0,299
Controlos	47	321,18	158,40	

*Nível de significância do teste T é de 0,05

4.3.4. Determinação da atividade da redutase da metahemoglobina

Para fazer a comparação RMHb entre as populações de doentes e controlos, e perceber se existiam diferenças estatisticamente significativas entre estas, efetuou-se o teste paramétrico T. Os resultados obtidos demonstram que não existem diferenças estatisticamente significativas nos níveis de RMHb entre os doentes e o grupo controlo ($p=0,974$) (Tabela 4-15).

Tabela 4-15 - Atividade da RMHb para a população de doentes com anemia das células falciformes e o grupo controlo

RMHb ($\mu\text{mol/g Hb/min}$)				
	N	Média	Desvio-padrão	Valor p*
Doentes	13	23,96	9,44	0,974
Controlos	41	22,40	8,02	

*Nível de significância do teste T é de 0,05

4.3.5. Determinação da atividade da redutase transmembranar

Para fazer a comparação RTM entre as populações de doentes e controlos, e perceber se existem diferenças estatisticamente significativas entre estas, efetuou-se o teste paramétrico T. Os resultados obtidos demonstram que não existem diferenças estatisticamente significativas nos níveis de RTM entre os doentes e o grupo controlo ($p=0,070$) (Tabela 4-16).

Tabela 4-16 - Atividade da RTM para a população de doentes com anemia das células falciformes e o grupo controlo

RTM (mmol/lcel/h)				
	N	Média	Desvio-padrão	Valor p*
Doentes	4	5,17	1,05	0,070
Controlos	47	3,96	1,34	

*Nível de significância do teste T é de 0,05

4.4. Avaliação da resposta à terapêutica da suplementação com citrulina

A avaliação do efeito da suplementação em citrulina foi efetuada através da análise estatística da evolução dos parâmetros hematológicos ou bioquímicos (hemoglobina, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM) desses doentes.

Inicialmente estudou-se a normalidade dos parâmetros referidos na população de doentes com anemia das células falciformes ao longo do mês 0, mês 1, mês 3 e mês 6 (Tabela XIII-1 do Anexo XIII). Os parâmetros que se consideraram ter distribuição normal ($p \geq 0,05$) para todos os meses foram a hemoglobina, HbS, RDW, reticulócitos, neutrófilos e MPO, utilizando-se na avaliação estatística o teste paramétrico ANOVA. Os parâmetros que se consideraram ter distribuição não normal ($p < 0,05$) para pelo menos um dos meses foram a bilirrubina, LDH, leucócitos e RTM utilizando-se na avaliação estatística o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Para a FA e RTM em que o valor foi incapaz de ser calculado para um dos meses optou-se por efetuar o teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

Seguidamente pretendeu-se fazer uma associação entre os parâmetros estudados e os diferentes meses da suplementação em citrulina, para avaliação do tratamento em citrulina, pelo teste paramétrico ANOVA e pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis (Tabela 4-17). Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) para nenhum dos parâmetros estudados ao longo dos meses.

Também se fizeram correlações de Spearman entre os parâmetros estudados e o tempo de modo a ver se existia um aumento ou um decréscimo dos parâmetros ao longo do tempo, optando-se por fazer uma normalização dos parâmetros da seguinte forma:

$$\frac{\text{tempo } 0}{\text{tempo } 0} = 1, \frac{\text{tempo } 1}{\text{tempo } 0} = x, \frac{\text{tempo } 2}{\text{tempo } 0} = y, \frac{\text{tempo } 3}{\text{tempo } 0} = w$$

Após a normalização dos dados, excluiu-se da análise da correlação da RTM por falta de dados.

No Anexo XIV estão representadas os gráficos que correspondem às correlações entre os parâmetros estudados e os meses da toma do suplemento citrulina (Figura XIV-1 a Figura XIV-11). Não se verificaram níveis de significância para as correlações entre os parâmetros e os meses da toma do suplemento citrulina.

Tabela 4-17 - Avaliação do tratamento com citrulina ao longo dos meses, nos parâmetros estudados

Parâmetros	Mês 0	Mês 1	Mês 3	Mês 6	Valor p*
Hemoglobina (g/dL)	8,68 ± 1,55 (12)	8,46 ± 1,09 (10)	8,30 ± 1,79 (9)	8,32 ± 1,61 (7)	0,938 ¹
HbS (%)	76,11 ± 8,14 (11)	79,54 ± 6,82 (7)	81,20 ± 4,58 (6)	80,53 ± 5,59 (6)	0,420 ¹
Bilirrubina (mg/dL)	1,81; 1,26 -5,57 (12)	1,79; 0,97- 3,40 (8)	2,13; 1,00- 2,59 (7)	2,28; 1,50- 3,15 (7)	0,632 ²
LDH (U/L)	451; 328-793 (11)	457; 305-652 (9)	519; 275-774 (9)	505; 343-690 (5)	0,882 ²
RDW (%)	21,99 ± 2,32 (10)	24,63 ± 1,62 (8)	24,16 ± 2,59 (6)	22,97 ± 2,78 (7)	0,106 ¹
Reticulócitos (%)	6,92 ± 3,39 (12)	9,07 ± 3,93 (10)	7,82 ± 2,84 (9)	7,37 ± 1,56 (7)	0,462 ¹
Leucócitos (células /μL)	10450; 7000- 33100 (10)	12050; 7000- 25900 (8)	9400; 8200- 21900 (8)	10400; 7100- 13500 (7)	0,795 ²
Neutrófilos (células /μL)	5101,50 ± 2107,33 (10)	6579,00 ± 3851,72 (8)	5711,43 ± 3394,45 (7)	5283,71 ± 2070,13 (7)	0,736 ¹
FA (μmol/g Hb/h)	347,10; 217,74- 605,44 (14)	412,62; 255,80-478,07 (7)	239,09; 226,70-251,49 (2)	355,13; 295,60-529,58 (6)	0,195 ²
MPO (ng/mL)	37,44 ± 18,57 (14)	38,88 ± 22,70 (5)	33,47 ± 12,68 (4)	52,53 ± 10,20 (4)	0,445 ¹
RMHb (μmol/g Hb/min)	21,90; 12,40- 48,55 (13)	20,84; 12,89- 30,54 (7)	25,44; 20,13- 30,74 (2)	21,79; 16,49- 37,88 (6)	0,899 ²
RTM (mmol/lcel/h)	4,90; 4,21-6,65 (4)	3,81; 2,99- 4,22 (4)	4,99; 2,93- 5,05 (3)	4,70; 4,41- 6,62 (3)	0,156 ²

* Valores de p <0,05 são considerados estatisticamente significativos

¹Teste ANOVA - as medidas estatísticas consideradas são: média ± desvio-padrão (n – número de indivíduos)

²Teste Kruskal-Wallis - as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo (n – número de indivíduos)

5. Discussão

A anemia das células falciformes é uma doença hereditária autossômica recessiva causada por uma mutação no gene da β -globina, que leva à presença de hemoglobina S. Embora seja uma doença monogénica caracteriza-se por uma grande variabilidade do seu fenótipo clínico. Esta variabilidade pode ser atribuída a fatores ambientais e fatores genéticos que poderão modular o seu fenótipo.

5.1. Determinações genéticas e associação com os parâmetros estudados

O haplótipo no agrupamento da β -globina é um dos moduladores do fenótipo da ACF melhor caracterizado pois os níveis de HbF variam de acordo com o haplótipo e estão relacionados com diferentes severidades de manifestações clínicas, sendo que o haplótipo Senegal está associado a níveis mais elevados de HbF, e por isso a uma menor severidade do fenótipo da ACF (Driss *et al*, 2009; Thein & Menzel, 2009). O haplótipo mais frequente na população em estudo foi o Bantu (48,1%), seguido do Senegal (32,7%) e por fim o Benim (19,2%). Estas frequências estão de acordo com o que era esperado (Lamy *et al*, 1995). Uma associação do haplótipo Senegal com níveis mais elevados de MPO ($p=0,046$) pode reforçar a importância deste haplótipo como sendo benéfico para os indivíduos com ACF, ainda que por um mecanismo desconhecido, pois a mieloperoxidase desempenha um papel importante no sistema de defesa do hospedeiro, estando deficiências nos níveis de MPO associados com processos inflamatórios (Costa *et al*, 2005). Este resultado também poderá dever-se a estarem a atuar outros fatores moduladores do nível de mieloperoxidase como, por exemplo, o rs2333227 no gene *MPO*, discutido mais à frente. Para os restantes parâmetros não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$).

A co-herança de α -talassémia na ACF também é considerado um dos principais moduladores o fenótipo hematológico e clínico. Nos doentes deste estudo frequências alélicas observadas foram de 84,6 % para o alelo $\alpha\alpha$ e uma frequência de 15,4 % para o alelo com a deleção de 3,7 kb ($-\alpha 3,7$), o que está abaixo dos cerca de 30% de indivíduos africanos com ACF que têm traços de α -talassémia (Steinberg & Sebastiani, 2012). Está bem estabelecido que a co-herança de α -talassémia diminui a concentração de HbS (Steinberg & Sebastiani, 2012), embora neste estudo não se tenha verificado diferenças estatisticamente significativas ($p=0,957$). Também está caracterizado que a co-herança de α -talassémia está relacionada com uma diminuição dos níveis da enzima LDH (Steinberg & Sebastiani, 2012) e de bilirrubina (Coelho *et al*, 2014; Steinberg & Sebastiani, 2012) o que também não se verifica

neste estudo ($p=0,279$ e $p=0,482$, respetivamente). Embora não se tenha verificado uma associação estatística entre os níveis de reticulócitos e a presença ou ausência da deleção α -talassémica -3,7 ($p=0,082$), pode observar-se que existe uma tendência para que os indivíduos que são heterozigóticos para a deleção α -talassémica -3,7 tenham níveis mais baixos de reticulócitos (média=5,95%), relativamente aos indivíduos sem esta deleção (média=8,81%), resultado este que já está descrito na literatura (Coelho *et al*, 2014). A razão para estes resultados não serem estatisticamente significativos poderão dever-se ao reduzido tamanho da amostra populacional. Neste estudo verificou-se que a co-herança da deleção α -talassémica -3,7 está associada a níveis mais elevados de FA comparativamente aos indivíduos sem a deleção ($p=0,022$), esta associação nunca foi estabelecida, podendo esta diferença ser atribuída a um mecanismo desconhecido. Este resultado também poderá dever-se a estarem a atuar outros fatores moduladores da FA. Para os restantes parâmetros não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p\geq 0,05$).

O gene *BCL11A* também está relacionado com o nível de HbF. Está bem estabelecida a relação entre o SNP rs11886868, gene *BCL11A*, e os níveis de HbF. Vários estudos indicam que a presença do alelo C neste SNP está associado com valores de HbF mais elevados (Bhanushali *et al*, 2015b; Pereira *et al*, 2015; Uda *et al*, 2008), sendo assim este alelo considerado protetor. Embora os resultados obtidos para a população em estudo não sejam estatisticamente significativos (OR=2,15; IC (95%) = [0,95-4,90]; $p=0,07$), parece existir uma maior prevalência do alelo C na população estudada, relativamente à população controlo. Quanto às associações estatísticas não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p\geq 0,05$) para nenhum dos parâmetros estudados entre os genótipos.

O gene *eNOS* codifica a enzima sintase do óxido nítrico endotelial que nas células endoteliais produz NO, um potente agente vasodilatador, antioxidante, antiadesivo e antitrombótico. Nos doentes com anemia das células falciformes observa-se um estado de resistência ao NO mediado pela inativação do NO pela Hb plasmática libertada no estado de hemólise crónica característica desta doença. O SNP rs2070744, na região do promotor, foi estudado na amostra populacional, tendo-se verificado que a presença do alelo C (genótipo CC ou CT) nos doentes é maior do que na população controlo (OR= 2,48; IC (95%) = [1,12-5,46]; $p=0,02$). A presença do alelo C tem sido considerado um fator de risco em algumas doenças (Cattaruzza *et al*, 2004; Melchers *et al*, 2006). Um estudo associou o alelo T com menores níveis de bilirrubina (Coelho *et al*, 2014), o que sugeriu ter um efeito protetor na hemólise na ACF. Embora não se tenha verificado uma associação estatística ($p=0,530$) na população em estudo, menores níveis de bilirrubina (mediana=1,74 mg/dL) também foram encontrados em indivíduos com o genótipo TT em comparação com indivíduos com o genótipo CT (mediana=2,00 mg/dL). Por outro lado, e contrariamente ao que seria de esperar, verificou-se que a

presença do genótipo TT está associado a níveis mais elevados de LDH ($p=0,042$) e de reticulócitos ($p=0,015$) relativamente ao genótipo CT. Para os restantes parâmetros (hemoglobina, HbS, RDW, leucócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM) não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p\geq 0,05$) entre os genótipos TT e CT. O SNP rs1799983, no exão 7, também foi estudado na amostra populacional, tendo-se verificado que a presença do alelo T (genótipo TT ou GT) nos doentes é maior do que na população controlo (OR= 2,89; IC (95%) = [1,22-6,86]; $p = 0,015$). Este SNP não tem sido tão associado como fator de risco em doenças, mas existe um estudo que associou o haplótipo 4a-T-C (alelo 4a do VNTR intrão 4, rs1799983 e rs2070744) com doentes com DCF com fenótipo severo, comparativamente ao haplótipo 4b-G-T que foi associado com um fenótipo menos severo (Nishank *et al*, 2013). Por outro lado, na população estudada, verificou-se que a presença do genótipo GG está associado a níveis mais elevados de LDH ($p=0,042$) e de reticulócitos ($p=0,006$) relativamente ao genótipo GT ou TT. Estes resultados sugerem que a presença do alelo T poderá ter um efeito protetor na hemólise nos indivíduos estudados, por estar associado com menores níveis de LDH e reticulócitos. Para os restantes parâmetros (hemoglobina, HbS, bilirrubina, RDW, leucócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM) não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p\geq 0,05$) entre os genótipos TT e CT. O VNTR no intrão 4 do gene *eNOS* também foi estudado nesta população. Um estudo recente sugeriu que alelo 4a do VNTR do intrão 4 do gene *eNOS* está relacionado com disfunção endotelial e vasculopatia na DCF (Tantawy *et al*, 2015). Na população estudada verificou-se que a presença do alelo 4a está associado a níveis mais elevados de neutrófilos relativamente à ausência do alelo 4a ($p=0,045$). Considerando-se que a presença do alelo 4a leva a uma diminuição do NO, um dos possíveis mecanismos para este resultado pode residir no facto do NO ter um papel importante na defesa contra infeções podendo diminuir ou aumentar a ativação de neutrófilos dependendo da sua concentração (Coleman, 2001), estando baixas concentrações de NO associadas a um aumento da ativação de neutrófilos e elevadas concentrações como inibidoras da ativação (Armstrong, 2001). Para os restantes parâmetros (hemoglobina, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos, FA, MPO, RMHb e RTM) não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p\geq 0,05$) entre a presença ou a ausência do alelo 4a. Estes resultados sugerem que estes polimorfismos no gene *eNOS* possam agir como moduladores genéticos principalmente do processo de hemólise, uma vez que dois biomarcadores de hemólise (LDH e reticulócitos) foram associados a dois polimorfismos deste gene, podendo ser úteis para a predição de uma suscetibilidade aumentada para complicações relacionadas com a hemólise.

O gene *HMOX-1* codifica a HO-1, enzima que catalisa a oxidação do grupo heme. Como os eritrócitos falciformes têm elevadas taxas de lise, libertando grande quantidade de Hb no plasma, esta

enzima tem um efeito citoprotetivo que é mediado através de efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da degradação do heme. O SNP rs2071746, localizado no promotor do gene, foi estudado na amostra populacional, tendo-se verificado que a presença do alelo A (genótipo AA ou AT) nos doentes é maior do que na população controlo (OR=2,44; IC (95%) = [1,01-5,89]; $p = 0,047$). A presença do alelo A deste SNP foi descrita como conferindo uma maior atividade ao promotor do gene (Ono *et al*, 2004). Quanto às associações estatísticas não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) para nenhum dos parâmetros estudados entre os genótipos. O STR rs3074372, localizado na região do promotor, foi estudado na amostra populacional. Existem estudos que sugerem que pessoas com um menor número de repetições GT têm uma maior expressão de hemoxigenase induzível (Hirai *et al*, 2003; Taha *et al*, 2010) e que este menor número de repetições está associado a uma menor taxa de hospitalização por síndrome torácica aguda em crianças com DCF (Bean *et al*, 2012). Quanto às associações estatísticas também não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) para nenhum dos parâmetros estudados entre os genótipos.

O gene *MTHFR* codifica a redutase do metilenotetrahidrofolato, enzima responsável por reduzir os níveis de homocisteína no plasma. Nos doentes com ACF, a hemólise crónica provoca um elevado requerimento de folato necessário para a eritropoiese normal e os indivíduos que apresentam uma deficiência em folato apresentam maiores níveis de homocisteína no sangue. O SNP rs1801133, localizado no exão 4, foi estudado na amostra populacional, tendo-se verificado que a presença do alelo T (genótipo TT ou CT) nos doentes é maior do que na população controlo (OR=2,60; IC (95%) = [1,13-5,97]; $p = 0,02$). Vários estudos já associaram o genótipo TT a níveis aumentados de homocisteína no plasma (Anderson *et al*, 1997; Clarke *et al*, 2012; Nienaber-Rousseau *et al*, 2013) e na AFC também já têm sido feitos estudos que associam a presença do alelo T com complicações características da doença (Hatzlhofer *et al*, 2012; Neto *et al*, 2006; Kutlar *et al*, 2001). Quanto às associações estatísticas não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) para nenhum dos parâmetros estudados entre os genótipos.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima lisossomal encontrada em neutrófilos e monócitos e desempenha um papel importante no sistema de defesa do hospedeiro, proporcionando uma atividade microbicida contra um grande número de microrganismos. Os doentes com ACF são suscetíveis a infeções constituindo uma causa comum de hospitalização. O SNP rs2333227, localizado na região do promotor deste gene, foi estudado na amostra populacional, tendo-se verificado que não existem diferenças alélicas estatisticamente significativas entre os doentes e população controlo (OR=1,92; IC (95%) = [0,80-4,63]; $p = 0,15$). Já foi demonstrado que a variante A reduz significativamente a transcrição do gene da MPO (London *et al*, 1997) e que aumenta a suscetibilidade a infeções em

doentes com ACF (Costa *et al*, 2005). Neste estudo não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) para nenhum dos parâmetros estudados entre os genótipos. Era de esperar encontrar-se uma associação estatisticamente significativa entre os níveis de MPO e os genótipos, em que os indivíduos com a variante A tivessem níveis mais baixos de MPO. A razão para este resultado não ser estatisticamente significativo provavelmente deveu-se ao reduzido tamanho da amostra populacional.

5.2. Determinações bioquímicas

A mieloperoxidase, como foi referido anteriormente, desempenha um papel importante no sistema de defesa do hospedeiro. Esta diferença estatisticamente significativa na concentração de MPO entre os doentes e o grupo controlo ($p=0,000$), nos quais os doentes apresentam valores mais elevados de MPO (mediana=29,56 ng/mL) em comparação com a população controlo (mediana=13,00 ng/mL) demonstra que esta enzima atua no combate a agentes patogénicos, uma vez que estes doentes são mais suscetíveis a infeções. Outra causa para esta grande diferença pode ser a diferenças (etárias, de género e etnia) entre a população de doentes e a população controlo.

A haptoglobina (Hp) tem como principal função ligar-se com alta afinidade à Hb livre, fazendo parte do mecanismo de eliminação da Hb livre pós-hemólise e protegendo organismo de diversas lesões oxidantes por parte do ferro. Dos indivíduos analisados 13 apresentavam o fenótipo Hp1-1, sendo este fenótipo o que capta com maior afinidade a Hb livre, reduzindo assim respostas inflamatórias associadas. Estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura pois uma maior frequência do fenótipo H1-1 é encontrada em África (Adekile & Haider, 2010), estando também associado com a DCF (Moreira & Naoum, 1990; Santos *et al*, 2011). O fenótipo Hp0 encontrado em 2 indivíduos pode ser explicado como sendo um fenótipo secundário devido ao aumento de consumo de Hp durante a hemólise.

A fosfatase ácida do eritrócito é uma enzima citoplasmática que catalisa a hidrólise de fosfotirosinas presentes em várias proteínas, sendo a sua função modulada por ROS. Os resultados obtidos demonstram que não existem diferenças estatisticamente significativas na concentração de FA entre os doentes e o grupo controlo ($p=0,299$).

A redutase da metahemoglobina existente nos eritrócitos catalisa a redução de metahemoglobina a hemoglobina. Assim, um aumento da concentração de oxidantes no eritrócito está envolvido na ativação desta enzima. Na ACF há uma maior produção de espécies reativas de oxigénio, o que irá predispor a hemoglobina à oxidação resultando na formação de metahemoglobina. Embora se

pudesse esperar que estes doentes apresentassem níveis superiores desta enzima relativamente à população controlo, os resultados obtidos demostram que não existem diferenças estatisticamente significativas nos níveis de RMHb entre os doentes e o grupo controlo ($p=0,974$).

A redutase transmembranar desempenha uma função importante na manutenção do equilíbrio redox no glóbulo visto ser responsável pela remoção de eletrões ao nível da membrana. Embora os resultados demostrem que não existam diferenças estatisticamente significativas nos níveis de RTM entre os doentes e o grupo controlo ($p=0,070$), parece existir uma tendência para que os doentes apresentem níveis mais elevados de RTM (média=5,17 mmol/lcel/h), relativamente à população controlo (média=3,96 mmol/lcel/h), podendo ser explicada pelo facto da RTM poder ser ativada por agentes oxidantes presentes nos doentes com ACF.

5.3. Avaliação da resposta à terapêutica da suplementação com citrulina

Os doentes com ACF apresentam uma menor biodisponibilidade nas células endoteliais de arginina, resultado do aumento no plasma da enzima arginase, após a hemólise, que contribui para uma perda da biodisponibilidade de óxido nítrico. A suplementação com citrulina parece ser uma forma mais eficaz de aumentar os níveis plasmáticos de arginina, uma vez que a arginina administrada oralmente ser transformada nas células intestinais em ornitina e ureia por ação da arginase. A citrulina administrada oralmente ultrapassa essa restrição, pois não é capturada pelo fígado, e é reciclada em arginina principalmente no rim e nas células endoteliais aumentando assim a produção de NO.

Neste estudo pretendeu avaliar-se o efeito da suplementação com citrulina (0,1 mg/Kg/dia) como suplemento alimentar em doentes com ACF num estudo do tipo observacional, ao longo do tempo (mês 0, mês 1, mês 3 e mês 6) através da evolução de vários parâmetros hematológicos e bioquímicos (hemoglobina, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM). Quinze indivíduos iniciaram o protocolo de suplementação em citrulina. Destes, apenas sete finalizaram o protocolo.

Para os parâmetros analisados ao longo dos meses, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre os tempos, em nenhum dos parâmetros estudados pelos testes ANOVA e Kruskal-Wallis.

Quanto às correlações de Spearman, também não se verificaram níveis de significância para as correlações entre os parâmetros e os meses da toma do suplemento citrulina. No entanto parece haver uma tendência para haver um decréscimo dos leucócitos ao longo do tempo ($p=0,075$; coeficiente de correlação=-0,320).

Uma das explicações para estes resultados não serem estatisticamente significativos poderá ser devida ao reduzido número de amostras, principalmente para os meses 1, 3 e 6. Outra explicação poderá residir na concentração de citrulina administrada (0,1 mg/Kg/dia). De facto, foi realizado um ensaio clínico piloto de fase II relacionando a suplementação com citrulina em indivíduos com DCF (Waugh *et al*, 2001), em que as concentrações de citrulina administradas foram de aproximadamente 0,1 g/kg duas vezes ao dia, onde foi observado um impacto bastante favorável nos sintomas observados, com um aumento dos níveis plasmáticos de arginina, e redução nas contagens elevadas de leucócitos totais e neutrófilos segmentados para dentro dos limites normais. O mecanismo proposto pelos autores deste estudo para a diminuição de leucócitos é o que com suficiente arginina disponível no plasma para a atividade da eNOS na produção de NO como produto, citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e leucócitos são suprimidos.

Dos indivíduos que finalizaram o protocolo de suplementação em citrulina, foi relatada uma melhoria clínica e do apetite para 6 indivíduos durante o protocolo. Embora não se possa descartar o efeito placebo, a mudança da sintomatologia nos doentes sugere mais do que um simples efeito placebo.

6. Conclusões

Neste estudo pretenderam-se identificar fatores genéticos e bioquímicos moduladores do fenótipo num grupo de 26 indivíduos com anemia das células falciformes e ainda estudar a resposta à terapêutica de suplementação com citrulina.

Relativamente às determinações genéticas, observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,046$) para os níveis de MPO entre os indivíduos com presença ou com ausência do haplótipo Senegal, verificando-se que a presença do haplótipo Senegal está associada com níveis mais elevados de MPO. Também se observou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,022$) para nos níveis de FA entre os indivíduos com deleção α -talassémica -3,7 e indivíduos sem deleção, verificando-se que a co-herança da deleção α -talassémica -3,7 está associada a níveis mais elevados de FA. Relativamente ao gene *eNOS*, verificou-se no SNP rs2070744 que a presença do alelo C nos doentes é maior do que na população controlo e que a presença do genótipo TT está associado a níveis mais elevados de LDH ($p=0,042$) e de reticulócitos ($p=0,015$). Também se verificou no SNP rs1799983 de *eNOS* que a presença do alelo T nos doentes é maior do que na população controlo e que a presença do genótipo GG está associado a níveis mais elevados de LDH ($p=0,042$) e de reticulócitos ($p=0,006$). Ainda no gene *eNOS* verificou-se que a presença do alelo 4a está associado a níveis mais elevados de neutrófilos relativamente à ausência do alelo 4a ($p=0,045$). No gene *HMOX-1*, no SNP rs2071746, verificou-se que a presença do alelo A nos doentes é maior do que na população controlo. Quanto ao SNP rs1801133 no gene *MTHFR*, verificou-se que a presença do alelo T nos doentes é maior do que na população controlo. Estes resultados revelaram várias associações entre os genótipos e fenótipos na AFC e diferenças estatisticamente significativas entre os doentes e populações controlo para vários polimorfismos.

Relativamente às determinações bioquímicas apenas se observou uma diferença estatisticamente significativa na concentração de MPO entre os doentes e o grupo controlo ($p=0,000$), nos quais os doentes apresentavam valores mais elevados de MPO.

Quanto ao estudo da resposta à terapêutica de suplementação em citrulina, embora não se tenham encontrado diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros analisados ao longo dos meses, foi relatada uma melhoria clínica e do apetite nos doentes que finalizaram o protocolo de suplementação em citrulina, facto este que pode sugerir um papel benéfico da citrulina nestes doentes.

Os resultados deste estudo reforçam, principalmente, a importância do NO na ACF. Pode presumir-se que o NO e possivelmente os seus precursores, como a citrulina, possam ser utilizados

como terapia nestes doentes. Contudo, os resultados deste estudo deverão ser confirmados numa amostra populacional de maior dimensão de forma a se obterem dados mais representativos e com uma maior validade. Neste estudo propuseram-se algumas hipóteses compatíveis com as associações entre o genótipo e o fenótipo, no entanto, futuros estudos funcionais serão necessários para desvendar os mecanismos envolvidos. Também deverão ser realizadas investigações mais aprofundadas sobre efeitos da suplementação com citrulina na anemia das células falciformes como, por exemplo, estudos com placebo e avaliações de um maior número de parâmetros, de forma a compreender melhor os benefícios deste suplemento na ACF.

7. Bibliografia

- Adekile, A.D. & Haider, M.Z. (2010) Haptoglobin gene polymorphisms in sickle cell disease patients with different β S-globin gene haplotypes. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, **19**, 447–450.
- Akinsheye, I., Alsultan, A., Solovieff, N., Ngo, D., Baldwin, C.T., Sebastiani, P., Chui, D.H.K. & Steinberg, M.H. (2011) Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*, **118**, 19–27.
- Anderson, J.L., King, G.J., Thomson, M.J., Todd, M., Bair, T.L., Muhlestein, J.B. & Carlquist, J.F. (1997) A mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with increased risk for coronary artery disease or myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, **30**, 1206–1211.
- Armstrong, R. (2001) The physiological role and pharmacological potential of nitric oxide in neutrophil activation. *International immunopharmacology*, **1**, 1501–12.
- Bain, B. (2006) Haemoglobinopathy Diagnosis 2nd ed. Oxford: Wiley Blackwell.
- Barbosa, L.C.P., Miranda-Vilela, A.L., Hiragi, C.D.O., Ribeiro, I.F., Daldegan, M.B., Grisolia, C.K. & Santos-Neto, L.L. (2014) Haptoglobin and myeloperoxidase (-G463A) gene polymorphisms in Brazilian sickle cell patients with and without secondary iron overload. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **52**, 95–107.
- Bean, C.J., Boulet, S.L., Ellingsen, D., Pyle, M.E., Barron-Casella, E., Casella, J.F., Payne, B., Driggers, J., Trau, H., Yang, G., Jones, K., Ofori-Acquah, S.F., Hooper, W.C. & DeBaun, M.R. (2012) Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with reduced incidence of acute chest syndrome among children with sickle cell disease. *Blood*, **120**, 3822–3828.
- Bhanushali, A., Patra, P.K., Nair, D., Verma, H. & Das, B.R. (2015a) Genetic variant in the BCL11A (rs1427407), but not HBS1-MYB (rs6934903) loci associate with fetal hemoglobin levels in Indian sickle cell disease patients. *Blood cells, molecules & diseases*, **54**, 4–8.
- Bhanushali, A., Patra, P.K., Pradhan, S., Khanka, S.S., Singh, S. & Das, B.R. (2015b) Genetics of fetal hemoglobin in tribal Indian patients with sickle cell anemia. *Translational Research*, **165**, 696–703.
- Board, P. & Pidcock, M. (1981) Methaemoglobinaemia resulting from heterozygosity for two NADH-Methaemoglobin reductase variants: characterization as NADH-Ferricyanide reductase. *British Journal of Haematology*, **47**, 361–370.
- Caboot, J.B., Jawad, A.F., McDonough, J.M., Bowdre, C.Y., Arens, R., Marcus, C.L., Mason, T.B., Smith-Whitley, K., Ohene-Frempong, K. & Allen, J.L. (2012) Non-invasive measurements of carboxyhemoglobin and methemoglobin in children with sickle cell disease. *Pediatric Pulmonology*, **47**, 808–815.
- Carter, K. & Worwood, M. (2007) Haptoglobin: A review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *International Journal of Laboratory Hematology*, **29**, 92–110.
- Cattaruzza, M., Guzik, T.J., Słodowski, W., Pelvan, A., Becker, J., Halle, M., Buchwald, A.B., Channon, K.M. & Hecker, M. (2004) Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. *Circulation Research*, **95**, 841–847.
- Charache, S., Terrin, M.L., Moore, R.D., Dover, G.J., Barton, F.B., Eckert, S. V., McMahon, R.P. & Bonds, D.R. (1995) Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *The New England journal of medicine*, **332**, 1317–1322.
- Chintagari, N.R., Nguyen, J., Belcher, J.D., Vercellotti, G.M. & Alayash, A.I. (2015) Haptoglobin attenuates hemoglobin-

- induced heme oxygenase-1 in renal proximal tubule cells and kidneys of a mouse model of sickle cell disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **54**, 302–306.
- Clarke, R., Bennett, D., Parish, S., Verhoef, P., Dötsch-Klerk, M., Lathrop, M., Xu, P., Nordestgaard, B.G., Holm, H., Hopewell, J.C., Saleheen, D., Tanaka, T., Anand, S.S., Chambers, J.C., Kleber, M.E., Ouwehand, W.H., Yamada, Y., Elbers, C., Peters, B., Stewart, A.F.R., et al (2012) Homocysteine and coronary heart disease: Meta-analysis of MTHFR case-control studies, avoiding publication bias. *PLoS Medicine*, **9**, 1–12.
- Coelho, A., Dias, A., Morais, A., Nunes, B., Ferreira, E., Picanço, I., Faustino, P. & Lavinha, J. (2014) Genetic variation in CD36, HBA, NOS3 and VCAM1 is associated with chronic haemolysis level in sickle cell anaemia: A longitudinal study. *European Journal of Haematology*, **92**, 237–243.
- Coleman, J.W.W. (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, **1**, 1397–1406.
- Conran, N. & Costa, F.F. (2009) Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clinical Biochemistry*, **42**, 1824–1838.
- Cormio, L., De Siati, M., Lorusso, F., Selvaggio, O., Mirabella, L., Sanguedolce, F. & Carrieri, G. (2011) Oral L-citrulline supplementation improves erection hardness in men with mild erectile dysfunction. *Urology*, **77**, 119–122.
- Costa, R.N., Conran, N., Albuquerque, D.M., Soares, P.H., Saad, S.T.O. & Costa, F.F. (2005) Association of the G-463A myeloperoxidase polymorphism with infection in sickle cell anemia. *Haematologica*, **90**, 977–979.
- Creager, M.A., Gallagher, S.J., Gierd, X.J., Coleman, S.M., Dzau, V.J. & Cooke, J.P. (1992) L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *The Journal of clinical investigation*, **90**, 1248–53.
- Cruz, A.S., Neves, J.S., Cano, J., Arteaga, M.P., Siqueira, C., Franco, M.H. & Bicho, M.P. (1995) Sistemas enzimáticos eritrocitários e seu potencial antioxidante nas grávidas submetidas a indução do trabalho de parto com PGE2 intracervical. *Acta Médica Portuguesa*, **8**, 263–266.
- Cumming, M., Olujohungbe, A., Keeney, S., Singh, H., Hay, C.R. & Serjeant, G.R. (1999) The methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism in patients with homozygous sickle cell disease and stroke. *British journal of haematology*, **107**, 569–571.
- Curis, E., Nicolis, I., Moinard, C., Osowska, S., Zerrouk, N., Bénazeth, S. & Cynober, L. (2005) Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids*, **29**, 177–205.
- Dissing, J., Dahl, O. & Svensmark, K. (1979) Phosphonic and arsonic acids as inhibitors of human red cell and phosphatase and their use in affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*, **569**, 159–176.
- Driss, A., Asare, K.O., Hibbert, J.M., Gee, B.E., Adamkiewicz, T. V. & Stiles, J.K. (2009) Sickle cell disease in the post genomic era: A monogenic disease with a polygenic phenotype. *Genomics Insights*, **2**, 23–48.
- Dzudzor, B., Nuwormegbe, S., Asmah, R.H., Sodji-tettey, N.A., Kudzi, W. & Brown, C. (2014) Haptoglobin Genotypes And Longevity Among The Ghanaian Population. *International Journal of Scientific & Tecnology Research*, **3**, 18–22.
- Efremov, G.D., Gjorgovski, I., Stojanovski, N., Diaz-Chico, J.C., Harano, T., Kutlar, F. & Huisman, T.H.J. (1987) One haplotype is associated with the Swiss type of hereditary persistence of fetal hemoglobin in the Yugoslavian population. *Human Genetics*, **77**, 132–136.
- Fu, X.H., Liu, D.P. & Liang, C.C. (2002) Chromatin structure and transcriptional regulation of the beta-globin locus. *Experimental cell research*, **278**, 1–11.

- Galanello, R. & Cao, A. (2011) Alpha-thalassemia. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, **13**, 83–88.
- Gilman, J.G. & Huisman, T.H.J. (1985) DNA sequence variation associated with elevated foetal G_γ globin production. *Blood*, **66**, 783–787.
- Grebing, C., Crane, F.L., Löw, H. & Hall, K. (1984) A transmembranous NADH-dehydrogenase in human erythrocyte membranes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **16**, 517–533.
- Grosso, M., Sessa, R., Puzone, S., Storino, M.R., Izzo, P. & Mediche, B. (2012) Molecular Basis of Thalassemia. In: Anemia. Silverberg D (ed) Italy: InTech.
- Guerra, A., Rego, C., Silva, D., Rogrigues, P., Silva, Z., Breitenfeld, L., Pinto, A. & Bicho, M. (2002) Tensão Arterial, Marcadores Genéticos e Biológicos numa População Pediátrica. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, **21**, 23–36.
- Hamajima, N., Matsuo, K., Suzuki, T., Nakamura, T., Matsuura, a, Tajima, K. & Tominaga, S. (2001) Low expression myeloperoxidase genotype negatively associated with Helicobacter pylori infection. *Japanese journal of cancer research : Gann*, **92**, 488–493.
- Hatzlhofer, B.L., Bezerra, M.A.C., Santos, M.N.N., Albuquerque, D.M., Freitas, E.M., Costa, F.F., Araújo, A.S. & Muniz, M.T.C. (2012) Polymorphic Variant C677T Is Associated to Vascular Complications in Sickle-Cell Disease. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, **16**, 1038–1043.
- Heijmans, B.T., Boer, J.M. a, Suchiman, H.E.D., Cornelisse, C.J., Westendorp, R.G.J., Kromhout, D., Feskens, E.J.M. & Slagboom, P.E. (2003) A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer Research*, **63**, 1249–1253.
- Helms, C. & Kim-shapiro, D.B. (2013) Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, **61**, 464–472.
- Hirai, H., Kubo, H., Yamaya, M., Nakayama, K., Numasaki, M., Kobayashi, S. & Suzuki, S. (2003) Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. *Blood*, **102**, 1619–1621.
- Houston, P.E., Rana, S., Sekhsaria, S., Perlin, E., Kim, K.S. & Castro, O.L. (1997) Homocysteine in sickle cell disease: relationship to stroke. *The American journal of medicine*, **103**, 192–196.
- Imaga, N.A. (2013) Phytomedicines and nutraceuticals: Alternative therapeutics for sickle cell anemia. *The Scientific World Journal*, **2013**, 1–12.
- Jeney, V., Balla, J., Yachie, A., Varga, Z., Vercellotti, G.M., Eaton, J.W. & Balla, G. (2002) Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*, **100**, 879–887.
- Kaore, S.N., Amane, H.S. & Kaore, N.M. (2013) Citrulline: Pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, **27**, 35–50.
- Kirsh, A., Wahab, H. & Sayed, H. (2011) The effect of L-arginine or L-citrulline supplementation on biochemical parameters and the vascular aortic wall in high-fat and high.cholesterol- fed rats. *Cell biochemistry and function*, **29**, 414–428.
- Kuhn, K.P., Harris, P.A., Cunningham, G.R., Robbins, I.M., Lawson, W.E., Summar, M.L. & Christman, B.W. (2002) Oral citrulline effectively elevates plasma arginine levels for 24 hours in normal volunteers. *Circulation*, **106**, 339–339.
- Kuma, F. (1981) Properties of methemoglobin reductase and kinetic study of methemoglobin reduction. *Journal of Biological Chemistry*, **256**, 5518–5523.

- Kunnas, T. a, Ilveskoski, E., Niskakangas, T., Laippala, P., Kajander, O.A., Mikkelsen, J., Goebeler, S., Penttilä, A., Perola, M., Nikkari, S.T. & Karhunen, P.J. (2002) Association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with risk of coronary artery disease and myocardial infarction in middle-aged men. *Journal of molecular medicine*, **80**, 605–609.
- Kutlar, A., Kutlar, F., Turker, I. & Tural, C. (2001) The methylene tetrahydrofolate reductase (C677T) mutation as a potential risk factor for avascular necrosis in sickle cell disease. *Hemoglobin*, **25**, 213–217.
- Lamy, S., Braga, L., Pacheco, P., Lavinha, J., Costa, G.G. & Ferreira, N.C. (1995) Profilaxia das doenças hereditárias do eritrócito. *Acta Médica Portuguesa*, **8**, 355–358.
- Langlois, M.R. & Delanghe, J.R. (1996) Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clinical Chemistry*, **42**, 1589–1600.
- Lavinha, J., Gonçalves, J., Faustino, P., Romão, L., Osório-Almeida, L., Peres, M.J., Picanço, I., Martins, M.C., Ducrocq, R., Labie, D. & Krishnamoorthy, R. (1992) Importation route of the sickle cell trait into Portugal: contribution of molecular epidemiology. *Human Biology*, **64**, 891–901.
- London, S.J., Lehman, T.A. & Taylor, J.A. (1997) Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. *Cancer research*, **57**, 5001–5003.
- Lorenz, A., Kahre, T., Mihailov, E. & Nikopensius, T. (2014) Are Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene Polymorphisms C677T and A1298C Associated with Higher Risk of Pediatric Migraine in Boys and Girls ? *Journal of Biomedical Science and Engineering*, **7**, 464–472.
- Maines, M.D. (1988) Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *The FASEB Journal*, **2**, 2557–2568.
- Martins, M.C., Olim, G., Melo, J., Magalhães, H.A. & Rodrigues, M.O. (1993) Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *Journal of medical genetics*, **30**, 235–239.
- McCarty, M.F. (2010) Potential utility of full-spectrum antioxidant therapy, citrulline, and dietary nitrate in the management of sickle cell disease. *Medical Hypotheses*, **74**, 1055–1058.
- Meisel, P., Krause, T., Cascorbi, I., Schroeder, W., Herrmann, F., John, U. & Kocher, T. (2002) Gender and smoking-related risk reduction of periodontal disease with variant myeloperoxidase alleles. *Genes and immunity*, **3**, 102–106.
- Melchers, I., Blaschke, S., Hecker, M. & Cattaruzza, M. (2006) The -786C/T single-nucleotide polymorphism in the promoter of the gene for endothelial nitric oxide synthase: Insensitivity to physiologic stimuli as a risk factor for rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **54**, 3144–3151.
- Menzel, S., Garner, C., Gut, I., Matsuda, F., Yamaguchi, M., Heath, S., Foglio, M., Zelenika, D., Boland, A., Rooks, H., Best, S., Spector, T.D., Farrall, M., Lathrop, M. & Thein, S.L. (2007) A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nature genetics*, **39**, 1197–1199.
- Miranda, A., Costa, S., Seuanes, F., Gaspar, G., Picanço, I. & Seixas, T. (2013) Estudo bioquímico de portadores de hemoglobinopatias. *INSA- artigos breves*, **6**, 16–18.
- Moinard, C. & Cynober, L. (2007) Citrulline: a new player in the control of nitrogen homeostasis. *The Journal of nutrition*, **137**, 1621S–1625S.
- Moinard, C., Nicolis, I., Neveux, N., Darquy, S., Bénazeth, S. & Cynober, L. (2008) Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the Citrudose pharmacokinetic study. *The British journal of nutrition*, **99**, 855–862.

- Moreira, H.W. & Naoum, P.C. (1990) Serum haptoglobin types in patients with hemoglobinopathies. *Hereditas*, **113**, 227–231.
- Morris, C., Kuypers, F.A., Larkin, S., Sweeters, N., Simon, J., P., V.E. & Styles, L.A. (2000) Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, **111**, 498–500.
- Morris, C., Morris, S.M., Hagar, W., van Warmerdam, J., Claster, S., Kepka-Lenhart, D., Machado, L., Kuypers, F.A. & Vichinsky, E.P. (2003) Arginine Therapy- A New Treatment for Pulmonary Hypertension in Sickle Cell Disease? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **168**, 63–69.
- Nakayama, M., Yasue, H., Yoshimura, M., Shimasaki, Y., Kugiyama, K., Ogawa, H., Motoyama, T., Saito, Y., Ogawa, Y., Miyamoto, Y. & Nakao, K. (1999) T-786 C mutation in the 5-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*, **99**, 2864–2870.
- Naoum, P.C. (2000) Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, **22**, 5–22.
- Neto, F., Lourenço, D.M., Noguti, M. a E., Morelli, V.M., Gil, I.C.P., Beltrão, a. C.S. & Figueiredo, M.S. (2006) The clinical impact of MTHFR polymorphism on the vascular complications of sickle cell disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **39**, 1291–1295.
- Nienaber-Rousseau, C., Ellis, S.M., Moss, S.J., Melse-Boonstra, A. & Towers, G.W. (2013) Gene-environment and gene-gene interactions of specific MTHFR, MTR and CBS gene variants in relation to homocysteine in black South Africans. *Gene*, **530**, 113–118.
- Nikpoor, B., Turecki, G., Fournier, C., Thérout, P. & Rouleau, G.A. (2001) A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. *American Heart Journal*, **142**, 336–339.
- Nishank, S.S., Singh, M.P.S.S., Yadav, R., Gupta, R.B., Gadge, V.S. & Gwal, A. (2013) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with sickle cell disease patients in India. *Journal of human genetics*, **7**, 1–5.
- Nolan, V.G., Wyszynski, D.F., Farrer, L.A. & Steinberg, M.H. (2005) Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease data from the Cooperative Study for Sickle. *Blood*, **106**, 3264–3267.
- Norris, K.A., Schrimpf, J.E., Flynn, J.L. & Morris, S.M. (1995) Enhancement of macrophage microbicidal activity: Supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, **63**, 2793–2796.
- Ono, K., Goto, Y., Takagi, S., Baba, S., Tago, N., Nonogi, H. & Iwai, N. (2004) A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese. *Atherosclerosis*, **173**, 315–319.
- Orringer, E. & Roer, M. (1979) An ascorbate-mediated transmembrane- reducing system of the human erythrocyte. *Journal of Clinical Investigation*, **63**, 53–58.
- Osowska, S., Duchemann, T., Walrand, S., Paillard, A., Boirie, Y., Cynober, L. & Moinard, C. (2006) Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, **291**, E582–E586.
- Osowska, S., Moinard, C., Neveux, N., Loï, C. & Cynober, L. (2004) Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut*, **53**, 1781–1786.
- Pereira, C., Relvas, L., Bento, C., Abade, A., Ribeiro, M.L. & Manco, L. (2015) Blood Cells , Molecules and Diseases Polymorphic variations in fl uencing fetal hemoglobin levels : Association study in beta-thalassemia carriers and in normal individuals of Portuguese origin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **54**, 315–320.
- Pieper, G.M. (1998) Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine


- on endothelial dysfunction. *Hypertension*, **31**, 1047–1060.
- Poillon, W.N., Kim, B.C., Rodgers, G.P., Noguchi, C.T. & Schechter, A.N. (1993) Sparing effect of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S at physiologic ligand saturations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 5039–5043.
- Powars, D., Weiss, J., Chan, L. & Schroeder, W. (1984) Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbidity in sickle cell anemia? *Blood*, **63**, 921–926.
- Ramkaran, P., Phulukdaree, A., Khan, S., Moodley, D. & Chuturgoon, A.A. (2015) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with increased risk of coronary artery disease in young South African Indians. *Gene*, **571**, 28–32.
- Rees, D.C., Williams, T.N. & Gladwin, M.T. (2010) Sickle-cell disease. *The Lancet*, **376**, 2018–2031.
- Roberts, G.T. & El Badawi, S.B. (1985) Red blood cell distribution width index in some hematologic diseases. *American journal of clinical pathology*, **83**, 222–226.
- Roguin, A., Hochberg, I., Nikolsky, E., Markiewicz, W., Meisel, S.R., Hir, J., Grenadier, E., Beyar, R. & Levy, A.P. (2001) Haptoglobin Phenotype as a Predictor of Restenosis After Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty. *The American Journal of Cardiology*, **87**, 330–332.
- Romero, M.J., Platt, D.H., Caldwell, R.B. & Caldwell, R.W. (2006) Therapeutic use of citrulline in cardiovascular disease. *Cardiovascular Drug Reviews*, **24**, 275–290.
- Roseff, S.D. (2009) Sickle cell disease: a review. *Immunohematology*, **25**, 67–74.
- Santos, M.N., Bezerra, M.A., Domingues, B.L., Zaccariotto, T.R., Oliveira, D.M., Costa, F.F., Araújo, S. & Sonati, F. (2011) Haptoglobin genotypes in sickle-cell disease. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, **15**, 709–713.
- Schnog, J.B., Duits, A.J., Muskiet, F.A.J., Cate, H.T., Rojer, R.A. & Brandjes D.P.M. (2004) Sickle cell disease; a general overview. *The Netherlands Journal of Medicine*, **62**, 364 – 374.
- Sebastiani, P., Farrell, J.J., Alsultan, A., Wang, S., Edward, H.L., Shappell, H., Bae, H., Milton, J.N., Baldwin, C.T., Al-Rubaish, A.M., Naserullah, Z., Al-Muhanna, F., Alsuliman, A., Patra, P.K., Farrer, L.A., Ngo, D., Vathipadiekal, V., Chui, D.H.K., Al-Ali, A.K. & Steinberg, M.H. (2015) BCL11A enhancer haplotypes and fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **54**, 224–230.
- Sedgewick, A.E., Timofeev, N., Sebastiani, P., So, J.C.C., Ma, E.S.K., Chan, L.C., Fucharoen, G., Fucharoen, S., Barbosa, C.G., Vardarajan, B.N., Farrer, L.A., Baldwin, C.T., Steinberg, M.H. & Chui, D.H.K. (2008) BCL11A is a major HbF quantitative trait locus in three different populations with β -hemoglobinopathies. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **41**, 255–258.
- Sharan, K., Surrey, S., Ballas, S., Borowski, M., Devoto, M., Wang, K.F., Sandler, E. & Keller, M. (2004) Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, **124**, 240–243.
- Shibahara, S. (2003) The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *The Tohoku journal of experimental medicine*, **200**, 167–186.
- Shiota, A., Hotta, Y., Kataoka, T., Morita, M., Maeda, Y. & Kimura, K. (2013) Oral L-Citrulline supplementation improves erectile function in rats with acute arteriogenic erectile dysfunction. *Journal of Sexual Medicine*, **10**, 2423–2429.
- Silva, A.P., Neves, J., Clara Bicho, M., Carvalho, R., Lopes, C., Gorjão Clara, J.P. & Bicho, M.P. (2006) Actividade de duas enzimas associadas à apoptose e envelhecimento celular na hipertensão arterial. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, **25**, 189–195.

- Silva, A.P., Sardinha, L.B., Llobet, S., Marta, M.J., Albergaria, F., Torres, A.L., Monteiro, C., Laires, M.J., Halpern, M.J. & Bicho, M.P. (2001) Polimorfismo genético da Fosfatase Ácida do eritrócito e risco cardiovascular em crianças e adolescentes saudáveis. *Revista portuguesa de cardiologia*, **21**, 65–71.
- Smith, H. a B., Canter, J.A., Christian, K.G., Drinkwater, D.C., Scholl, F.G., Christman, B.W., Rice, G.D., Barr, F.E. & Summar, M.L. (2006) Nitric oxide precursors and congenital heart surgery: a randomized controlled trial of oral citrulline. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, **132**, 58–65.
- Stamatoyannopoulos, G. (2005) Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Experimental Hematology*, **33**, 259–271.
- Stanley, A.C. & Christian, J.M. (2013) Sick cell disease and perioperative considerations: Review and retrospective report. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **71**, 1027–1033.
- Steinberg, M.H. (2005) Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, **129**, 465–481.
- Steinberg, M.H. & Embury, H. (1986) Alpha-thalassemia in blacks: Genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood*, **68**, 985–990.
- Steinberg, M.H. & Sebastiani, P. (2012) Genetic modifiers of sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, **87**, 795–803.
- Stephens, J. & Levy, R. (1994) Effects of valproate and citrulline on ammonium-induced encephalopathy. *Epilepsia*, **35**, 164 – 171.
- Taha, H., Skrzypek, K., Guevara, I., Nigisch, A., Mustafa, S., Grochot-Przeczek, A., Ferdek, P., Was, H., Kotlinowski, J., Kozakowska, M., Balcerczyk, A., Muchova, L., Vitek, L., Weigel, G., Dulak, J. & Jozkowicz, A. (2010) Role of heme oxygenase-1 in human endothelial cells: Lesson from the promoter allelic variants. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **30**, 1634–1641.
- Tantawy, A.A.G., Adly, A.A.M., Ismail, E.A.R. & Aly, S.H. (2015) Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 VNTR polymorphism in sickle cell disease: Relation to vasculopathy and disease severity. *Pediatric Blood & Cancer*, **62**, 389–394.
- Taylor VI, J.G., Nolan, V.G., Mendelsohn, L., Kato, G.J., Gladwin, M.T. & Steinberg, M.H. (2008) Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: Association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. *PLoS ONE*, **3**, 1–9.
- Teng, Z., Wang, L., Cai, S., Yu, P., Wang, J., Gong, J. & Liu, Y. (2013) The 677C>T (rs1801133) Polymorphism in the MTHFR Gene Contributes to Colorectal Cancer Risk: A Meta-Analysis Based on 71 Research Studies. *PLoS ONE*, **8**, 1–10.
- Thakur, T.J., Guindo, A., Cullifer, L.R., Li, Y., Imumorin, khide G., Diallo, D.A. & Thomas, B.N. (2014) Endothelin-1 but not Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism is Associated with Sickle Cell Disease in Africa. *Gene Regulation and Systems Biology*, **8**, 119–126.
- Thein, S.L. & Menzel, S. (2009) Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *British Journal of Haematology*, **145**, 455–467.
- Thein, S.L., Menzel, S., Lathrop, M. & Garner, C. (2009) Control of fetal hemoglobin: New insights emerging from genomics and clinical implications. *Human Molecular Genetics*, **18**, 216–223.
- Tsukada, T., Yokoyama, K., Arai, T., Takemoto, F., Hara, S., Yamada, a, Kawaguchi, Y., Hosoya, T. & Igari, J. (1998) Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochemical and biophysical research communications*, **245**, 190–193.
- Uda, M., Galanello, R., Sanna, S., Lettre, G., Sankaran, V.G., Chen, W., Usala, G., Busonero, F., Maschio, A., Albai, G.,

- Piras, M.G., Sestu, N., Lai, S., Dei, M., Mulas, A., Crisponi, L., Naitza, S., Asunis, I., Deiana, M., Nagaraja, R., et al (2008) Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 1620–1625.
- Voetsch, B., Jin, R.C. & Loscalzo, J. (2004) Nitric oxide insufficiency and atherothrombosis. *Histochemistry and Cell Biology*, **122**, 353–367.
- Voon, H.P.J. & Vadolos, J. (2008) Controlling alpha-globin: A review of alpha-globin expression and its impact on beta-thalassemia. *Haematologica*, **93**, 1868–1876.
- Wali, Y.A., Al-Lamki, Z., Hussein, S.S., Bererhi, H., Kumar, D., Wasifuddin, S., Zachariah, M. & Ghosh, K. (2002) Splenic function in Omani children with sickle cell disease: correlation with severity index, hemoglobin phenotype, iron status, and alpha-thalassemia trait. *Pediatric hematology and oncology*, **19**, 491–500.
- Waugh, W.H., Daeschner, C.W., Files, B.A., McConnell, M.E. & Strandjord, S.E. (2001) Oral citrulline as arginine precursor may be beneficial in sickle cell disease: early phase two results. *Journal of the National Medical Association*, **93**, 363–371.
- Wobeto, V.P.D.A., Zaccariotto, T.R. & Sonati, M.D.F. (2008) Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance. *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 602–620.
- Wood, A. (1999) Management of sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, **340**, 1021–1030.
- Xu, J., Sankaran, V.G., Ni, M., Menne, T.F., Puram, R. V., Kim, W. & Orkin, S.H. (2010) Transcriptional silencing of γ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes and Development*, **24**, 783–789.

8. Anexos

Anexo I - Consentimento informado

Projeto DREPANOCITOSE E CITRULINA	nº Identificação: HDE-SS-□□□
 CENTRO HOSPITALAR DE LISBOA <small>CENTRAL EPE</small>	ETIQUETA DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE (se disponível)
CONSENTIMENTO ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDOS DE INVESTIGAÇÃO EM SAÚDE	
<p>A relação investigador-participante é baseada na confiança mútua. O CHLC, EPE dispõe de procedimentos que permitem salvaguardar os direitos de ambos.</p> <p>O investigador obriga-se a informar o participante doente sobre a natureza da sua participação no estudo, potenciais vantagens e inconvenientes, podendo o participante aceitar ou não participar no estudo.</p>	
Área/Unidade: Área de Pediatria Médica / Unidade de Hematologia	
Título do estudo: DREPANOCITOSE E CITRULINA	
Procedimentos principais: <p>No âmbito da consulta de rotina de Hematologia será recolhida a história clínica e familiar e realizadas análises ao sangue, para avaliação de parâmetros de rotina e específicos (de bioquímica e de genética)</p> <p><i>Confirmo que expliquei ao participante, aos progenitores ou ao seu representante legal, de forma adequada e inteligível, os procedimentos, assim como os potenciais riscos e inconvenientes, e que entreguei o folheto de informação complementar.</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-end; margin-top: 20px;"><div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center; width: 20%;">Se aplicável, assinatura do médico</div><div style="width: 80%;"><p>Assinatura do investigador:</p><p>Nº mec. [][][][][][] Cédula Profissional [][][][][][]</p><p>Data: [][][]-[][][]-[][][][][][]</p></div></div>	
A preencher pelo participante ou pelo seu representante legal <p><i>Declaro que me foram explicados de forma adequada e inteligível o objectivo e natureza da investigação e o(s) procedimento(s) a(os) que serei sujeito. Foram-me explicados potenciais riscos e inconvenientes do(s) procedimento(s) proposto(s), que foram por mim compreendidos e aceites, concordando em participar no estudo.</i></p> <p>Participante:</p> <p>Representante Legal*: Qualidade:</p> <p>Assinatura: Documento:</p> <p>Data: [][][]-[][][]-[][][][][][]</p> <p><small>* O representante legal deverá fazer prova dos seus poderes para representar do participante</small></p>	
<small>INV.103 - Procedimento Multisectorial, Consentimento informado e esclarecido para investigação. C.H.L.C. Mod. 0035 - C.I.</small>	

Anexo II - Procedimento experimental para o tratamento das amostras para as determinações bioquímicas

Sangues colhidos em tubos com EDTA foram colocados a centrifugar durante 10 minutos a 2000 rotações por minuto (rpm), a 4° C. Dos tubos com EDTA foi retirado o plasma que foi distribuído em alíquotas e guardado a -20° C.

Separaram-se os eritrócitos do sangue total através de 4 centrifugações a 2000 rpm durante 10 minutos, sendo a primeira para separar o plasma dos restantes componentes do sangue, e as restantes lavagens com NaCl 0,9% (v/v) para se ficar apenas com os eritrócitos.

Após a última centrifugação remove-se o NaCl e a partir dos glóbulos vermelhos lavados são preparados hemolisados (glóbulos vermelhos diluídos 1:40 em EDTA 2,7 mM ajustado a pH 7 com mercaptoetanol 10%).

Anexo III - Extração de DNA pelo método de *salting-out*

Reagentes:

TKMX-100: 2,5 % (v/v) Triton X-100 diluído em tampão TKM1

Tampão TKM1: 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA

Tampão TKM2: 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 0,4 M NaCl

IGEPAL CA-630 - octilfenoxi polietoxietanol (Sigma-Aldrich)

Dodecil sulfato de sódio (SDS- Sodium dodecyl sulfate) a 10%

NaCl 6M

Tampão TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA

Etanol absoluto

Protocolo experimental:

1. O DNA foi extraído de sangue periférico colhido num tubo com anticoagulante EDTA.
2. Transferiu-se 2 mL para um tubo rolhado e graduado de 10 mL.
3. Adicionou-se 1 volume de TKM X-100
4. Adicionou-se 25 µl de IPGEPAL CA 630 por cada ml de sangue.
5. O tubo foi agitado 4-5 vezes por inversão vigorosa.
6. Seguiu-se uma centrifugação a 2200 rpm, à temperatura de aproximadamente 4° C e durante 15 minutos, que deve ser repetida caso o *pellet* formado não adira ao fundo do tubo.
7. O sobrenadante foi rejeitado e ao *pellet* que contém, entre outros constituintes, ao DNA, foi adicionado 1 ml de tampão TKM 1 por cada ml de sangue.
8. Centrifugou-se à mesma temperatura, a 1600 rpm e por um período de 10 min e foram repetidos os passos de rejeição do *pellet* e adição de tampão TKM 1.
9. O passo anterior foi repetido no máximo duas vezes de modo a ser obtido um *pellet* branco evitando perdas excessivas de DNA.
10. Ressuspendeu-se o *pellet* (vortex) na solução de TKM 2 numa proporção de 160 ml por ml de sangue.
11. Adicionou-se 10 µl de SDS 10% por ml de sangue e a mistura foi ressuspensa com o auxílio de um micropipeta.
12. Incubou-se a 55° C por 10 minutos.

13. Ao fim deste intervalo de tempo o conteúdo do tubo foi transferido para um *eppendorf* ao qual se juntou 60 µl de NaCl saturado por ml de sangue. Visualizou-se de imediato a precipitação de proteínas existentes na suspensão de DNA que forma uma fase branca opaca distinta de outra completamente transparente (suspensão de DNA).
14. Agitou-se o tubo *eppendorf* no *vortex*.
15. Centrifugou-se numa centrífuga de *eppendorfs*, a 12000 rpm, à temperatura ambiente e por 30 minutos num processo denominado *salting-out*.
16. Verteu-se o sobrenadante resultante da centrifugação anterior para um tubo de vidro e adicionou-se aproximadamente 2 volumes de etanol absoluto previamente arrefecido a -20° C.
17. O tubo, devidamente selado com parafilme, foi invertido suavemente até precipitação do DNA.
18. Ressuspendeu-se o DNA em 200 µl de Tampão TE previamente colocados no tubo de *eppendorf* devidamente rotulado e armazenado a 4° C.

Anexo IV - Tampões para PCR e para eletroforese em gel de agarose

Tampão de PCR α 10X

116 mM (NH₄)₂SO₄
670 mM Tris-HCl pH 8,8
15 mM MgCl₂
0,67 mM EDTA
100 mM β-mercaptoetanol

Tampão de PCR B 10X

50 mM KCl
10 mM Tris-HCl pH 8,8
150 μM MgCl₂
0,01 % (p/v) gelatina
DNTPs (0,04 x 100 mM)

Tampão de PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012622_PCR_Master_2X_K0171_UG.pdf

Tampão TAE 10X

48,4g Tris
11,4 mL de ácido acético
37,22g Na₂EDTA + 4g NaOH para 200mL H₂O

Tampão TBE 10X

1,0 M Tris
0,9 M ácido bórico

Anexo V - PCR: oligonucleótidos iniciadores, condições e tamanho dos fragmentos

Tabela V-1 - Composição da mistura reacional para pesquisa da mutação drepanocítica, condições de PCR, composição dos oligonucleótidos iniciadores e tamanho dos fragmentos

Mistura reacional	Protocolo (μL)	Condições		Oligonucleótidos	Fragmentos (pb)
Tampão B (10x)	23,4	94°C, 5 min		Direto: 5'ACCTCACCTGTGGAGCCAC3' Tm: 66,0°C Reverso: 5'ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACACC3' Tm: 81,0°C	375
Oligonucleótido direto (25 pmol/μL)	0,5	94°C, 1 min	28 Ciclos		
Oligonucleótido reverso (25 pmol/μL)	0,5	65°C, 1 min			
Taq Polimerase (5U/μL)	0,1	72°C, 1 min			
DNA molde (100 ng/μL)	0,5	72°C, 10 min			

Tabela V-2 - Composição da mistura reacional para os SNPs rs7482144, rs2070972 e rs968857 para construção do haplótipo do agrupamento génico da β-globina, condições de PCR, composição dos oligonucleótidos iniciadores e fragmentos obtidos

SNP	Mistura reacional	Protocolo (μL)	Condições		Oligonucleótidos	Fragmentos (pb)
rs7482144 XmnI (6γ)	Tampão B (10x)	23,4	94°C, 5 min		Direto: 5'GCACTGAAACTGTTGCTTTA TAGGAT3' Tm: 55,7°C Reverso: 5'TGGCGTCTGGACTAGGAGCT TATT3' Tm: 59,5°C	677
	Oligonucleótido direto (25 pmol/μL)	0,5	94°C, 40 seg	28 ciclos		
	Oligonucleótido reverso (25 pmol/μL)	0,5	55°C, 40 seg			
	Taq Polimerase (5 U/μL)	0,1	72°C, 50 seg			
	DNA molde (100 ng/μL)	0,5	72°C, 10 min			
rs2070972 HindIII (6γ)	Tampão B (10x)	23,4	94°C, 5 min		Direto: 5'AGTGCTGCAAGAAGAACAA CTACC3' Tm: 57,5°C Reverso: 5'CTGTGACCAGTCTGTAGACT TAAG3' Tm: 54,4°C	1058
	Oligonucleótido direto (25 pmol/μL)	0,5	94°C, 40 seg	28 ciclos		
	Oligonucleótido reverso (25 pmol/μL)	0,5	58°C, 40 seg			
	Taq Polimerase (5 U/μL)	0,1	72°C, 50 seg			
	DNA molde (100 ng/μL)	0,5	72°C, 10 min			
rs968857 HincII (3'ψβ)	Tampão B (10x)	22,9	94°C, 5 min		Direto: 5'GTACTCATACTTTAAGTCCTA ACT3' Tm: 49,5°C Reverso: 5'TAAGCAAGATTATTCTGGT CTCT3' Tm: 51,7°C	913
	Oligonucleótido direto (25 pmol/μL)	0,5	94°C, 1 min	30 ciclos		
	Oligonucleótido reverso (25 pmol/μL)	0,5	60°C, 1 min			
	Taq Polimerase (5 U/μL)	0,1	72°C, 1 min			
	DNA molde (100 ng/μL)	1	72°C, 10 min			

Tabela V-3 - Composição da mistura reacional para os SNPs rs11886868 do gene *BCL11A*, rs2070744 e rs1799983 do gene *eNOS*, rs2333227 do gene *MPO* e rs1801133 do gene *MTHFR*, condições de PCR, composição dos oligonucleótidos iniciadores e fragmentos obtidos

SNP	Mistura reacional	Protocolo (μL)	Condições		Oligonucleótidos	Fragmentos (pb)
rs11886868 <i>BCL11A</i>	Tampão B (10x)	22,9	94°C, 5 min		Direto: 5'GGCTAGAGTCTTGAGGAGA CCC3' Tm: 58,8°C	658
	Oligonucleótido direto (25 pmol/μL)	0,5	94°C, 1 min	30 ciclos	Reverso: 5'GGGCTCCCTGGACTCAAAC C3' Tm: 59,8°C	
	Oligonucleótido reverso (25 pmol/μL)	0,5	62°C, 1 min			
	Taq Polimerase (5 U/μL)	0,1	72°C, 1 min			
	DNA molde (100 ng/μL)	1	72°C, 10 min			
rs2070744 <i>eNOS</i>	Tampão B (10x)	22,9	94°C, 10 min		Direto: 5'CCCCACCTGCAT TCTGGGAA3' Tm: 60,0°C	244
	Oligonucleótido direto (25pmol/μL)	0,5	94°C, 30 seg	30 ciclos	Reverso: 5'TCCAGCCCCAATTTCTGG 3' Tm: 60,1°C	
	Oligonucleótido reverso (25pmol/μL)	0,5	61°C, 30 seg			
	Taq Polimerase (5 U/μL)	0,1	72°C, 40 seg			
	DNA molde (100 ng/μL)	1	72°C, 10 min			
rs1799983 <i>eNOS</i>	Tampão B (10x)	22,9	94°C, 10 min		Direto: 5'AAGGCAGGAGACAGTGGAT GGA3' Tm: 60,2°C	248
	Oligonucleótido direto (25 pmol/μL)	0,5	94°C, 30 seg	30 ciclos	Reverso: 5'CCCAGTCAATCCCTTTGGTG CTCA3' Tm: 61,3°C	
	Oligonucleótido reverso (25 pmol/μL)	0,5	61°C, 30 seg			
	Taq Polimerase (5 U/μL)	0,1	72°C, 40 seg			
	DNA molde (100 ng/μL)	1	72°C, 10 min			
rs2333227 <i>MPO</i>	Master Mix (2x)	12,5	94°C, 2 min		Direto: 5'CCGTATAGGCACAATGGTG AG3' Tm: 70,0°C	350
	Oligonucleótido direto (10 pmol/μL)	1	94°C, 30 seg	30 ciclos	Reverso: 5'GCAATGGTTTCAAGCGATTC TTC3' Tm: 64,0°C	
	Oligonucleótido reverso (10 pmol/μL)	1	61°C, 30 seg			
	H ₂ O	9,5	72°C, 40 seg			
	DNA molde (100 ng/μL)	1	72°C, 7 min			
rs1801133 <i>MTHFR</i>	Master Mix (2x)	12,5	94°C, 2 min		Direto: 5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGC GGA3' Tm: 73,27°C	198
	Oligonucleótido direto (10 pmol/μL)	1	94°C,30 seg	33 ciclos	Reverso: 5'AGGACGGTGCGGTGAGAGT G3 Tm: 70,4°C	
	Oligonucleótido reverso (10 pmol/μL)	1	62°C,30 seg			
	H ₂ O	9,5	72°C,1 min			
	DNA molde (100 ng/μL)	1	72°C, 7 min			

Tabela V-4 - Composição da mistura reacional, condições de PCR, composição dos oligonucleótidos iniciadores e fragmentos obtidos para o VNTR no intrão 4 de *eNOS*

Mistura reacional	Protocolo (μL)	Condições		Oligonucleótidos	Fragmentos (pb)
Master Mix (2x)	12,5	94°C, 2 min		Direto: 5'AGGCCCTATGGTAGTGCCTT3' Tm: 64,0°C Reverso: 5'TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC3' Tm: 60,0°C	447 420 393
Oligonucleótido direto (10 pmol/μL)	1	94°C, 30 seg	30 ciclos		
Oligonucleótido reverso (10 pmol/μL)	1	55°C, 30 seg			
H ₂ O	9,5	72°C, 45 seg			
DNA molde (100 ng/μL)	1	72°C, 5 min			

Anexo VI - Gap-PCR: pesquisa da deleção alfa-talassêmica

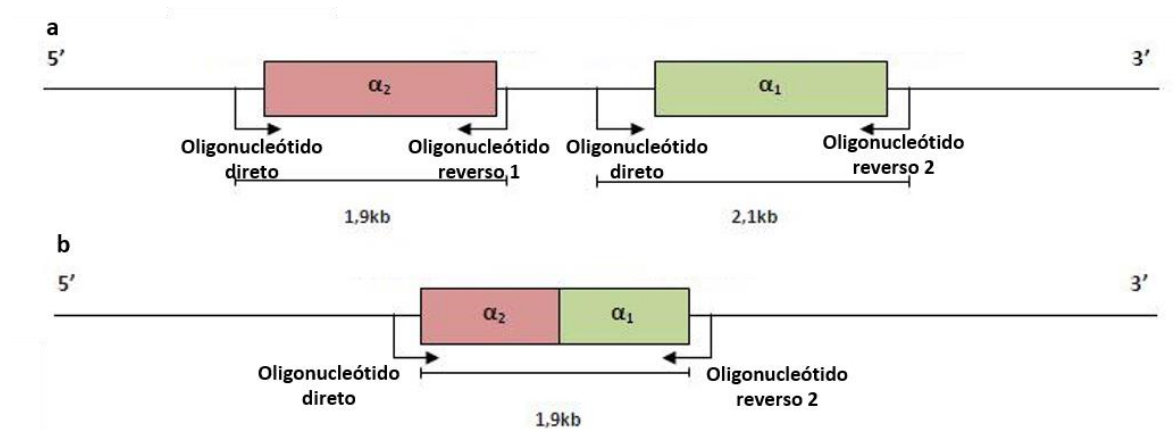


Figura VI-1 - Genes da α_2 - e α_1 -globina. a) Esquema representativo dos genes da α_2 - e α_1 -globina e os respectivos oligonucleótidos usados para a sua amplificação, bem como o tamanho do fragmento amplificado. b) Representação do gene híbrido $\alpha_2\alpha_1$ resultante da deleção $-\alpha_{3,7}$ e os respectivos oligonucleótidos, bem como o tamanho do fragmento amplificado.

Tabela VI-1 - Composição da mistura reacional utilizada para a detecção da deleção $-\alpha_{3,7}$ e as respectivas condições de Gap-PCR, composição dos oligonucleótidos iniciadores e fragmentos obtidos

Mistura reacional	Protocolo (μL)		Condições		Oligonucleótidos	Fragmentos (kb)
	Mistura a	Mistura b				
Tampão α (10x)	2,5	2,5	94°C, 5 min		Direto: 5'GATGCACCCACTGGACTCCT3' Tm: 53,6°C Reverso 1: 5'CCATTGTTGGCACATTCCGG3' Tm: 58,2°C Reverso 2: 5'CCATGCTGGCACGTTTCTGA3' Tm: 56,8°C	2,1
DMSO	2,5	2,5				
BSA (10 mg/mL)	0,4	0,4	94°C, 1 min	32 Ciclos		
MgCl ₂ (0,1mM)	0,5	0,5				
dNTPs (100 mM)	0,5	0,5				
Oligonucleótido direto (25pmol/μL)	0,5	0,5	55°C, 1 min			
Oligonucleótido reverso 1 (25 pmol/μL)	0,5	-	72°C, 3 min			1,9
Oligonucleótido reverso 2 (25 pmol/μL)	-	0,5				
Taq Polimerase (5U/μL)	0,2	0,2	72°C, 5 min			
H ₂ O	16,4	16,4				
DNA molde (100 ng/μL)	1	1				

Anexo VII - PCR alelo-específico: oligonucleótidos iniciadores, condições e tamanho dos fragmentos

Tabela VII-1 - Composição da mistura reacional, condições de PCR-alelo específico, composição dos oligonucleótidos iniciadores e fragmentos obtidos para o SNP rs2071746 em *HMOX-1* e para o GeneScan posterior que permite determinar o número de repetições GT presentes nos mesmos fragmentos

Mistura reacional	Protocolo (μL)		Condições		Oligonucleótidos	Fragmentos (pb)
	Mistura a	Mistura b				
Tampão B (10x)	22,9	22,9	94°C, 5 min		Direto A: 5'FAM -TGATGTTGCCACCAGGCTA3' Tm: 59,1°C Direto T: 5'FAM -TGATGTTGCCACCAGGCTT3' Tm: 59,9°C Reverso: 5'GGAGCAGTCATATGACCCTTGGG3' Tm: 59,4°C	Cerca de 290bp
Oligonucleótido direto A (25 pmol/μL)	0,5	-	94°C, 30 seg	28 Ciclos		
Oligonucleótido direto T (25 pmol/μL)	-	0,5				
Oligonucleótido reverso (25 pmol/μL)	0,5	0,5	61°C, 30 seg			
Taq Polimerase (5 U/μL)	0,1	0,1	72°C, 40 seg			
DNA molde (100 ng/μL)	1	1	72°C, 10 min			

Anexo VIII - Ensaios de restrição: condições, tamanho de fragmentos obtidos e determinação do haplótipo

Tabela VIII-1 - Condições das reações de restrição para a confirmação da mutação drepanocítica e tamanho de fragmentos obtidos

Enzima de restrição	Sequência reconhecida	Base	Clivagem	Mistura reacional	Protocolo (μL)	Temperatura/Tempo	Fragmentos (pb)
Bsu36I	5'...CCTNAGG...3' 3'...GGANTCC...5'	A	+	Bsu36I (10 U/μL)	0,5	37°C/ ≥3h	375
		T	-	H ₂ O	4,5		199
				Produto de PCR	15		176

N- Qualquer nucleótido; Seta – local de clivagem da enzima de restrição

Tabela VIII-2- Condições das reações de restrição para os SNPs rs7482144, rs2070972e rs968857 para construção do haplótipo do agrupamento génico da β-globina e tamanho de fragmentos obtidos

SNP	Enzima de restrição	Sequência reconhecida	Base	Clivagem	Mistura reacional	Protocolo (μL)	Temperatura/Tempo	Fragmentos (pb)
rs7482144 XmnI (C _γ)	XmnI	5'...GAANNNTTC...3' 3'...CTTNNNAAG...5'	T	+	Tampão CutSmart (10x)	2	37°C/ ≥3h	677
					XmnI (20 U/μL)	0,25		462
			C	-	H ₂ O	2,75		215
					Produto de PCR	15		
rs2070972 HindIII (C _γ)	HindIII	5'...AAGCTT...3' 3'...TTCGAA...5'	T	+	Tampão NEB2 (10x)	2		785
					HindIII (12 U/μL)	0,42		694
			G	-	H ₂ O	2,58		273
					Produto de PCR	15		91
rs968857 HincII (3'ψβ)	HincII	5'...GTYRAC...3' 3'...CAR _Y TG...5'	A	+	HincII (10 U/μL)	0,5		913
					H ₂ O	4,5		479
			G	-	Produto de PCR	15		434

N- qualquer nucleótido; Y- nucleótido C ou T; R- nucleótido A ou G; Seta – local de clivagem da enzima de restrição

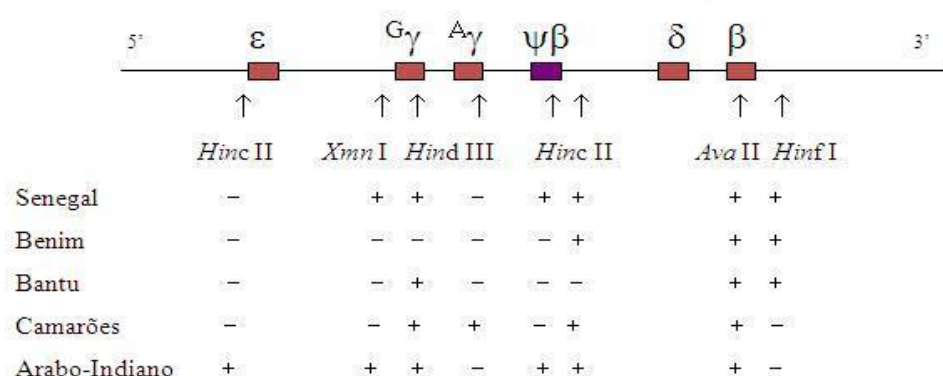


Figura VIII-1 - Esquema representativo do agrupamento gênico da β -globina, localização dos RFLPs para a construção do haplótipo e classificação dos haplótipos.

Tabela VIII-3 - Condições das reações de restrição para os rs11886868 do gene *BCL11A*, rs2070744 e rs1799983 do gene *eNOS*, rs2333227 do gene *MPO* e rs1801133 do gene *MTHFR* e tamanho dos fragmentos obtidos

SNP	Enzima de restrição	Sequência reconhecida	Base	Clivagem	Mistura reacional	Protocolo (μ L)	Temperatura/Tempo	Fragmentos (pb)
rs11886868 <i>BCL11A</i>	MbolI	5'...GAAGA(N) ∇ ...3' 3'...CTTCT(N) ∇ ...5'	C	+	Tampão B fermentas (10x)	2	37°C/ \geq 3h	440
					MbolI (5 U/ μ L)	1		383
			T	-	H ₂ O	2		218
					Produto de PCR	15		57
rs1799983 <i>eNOS</i>	Mbol	5'...GATC...3' 3'...CTAG...5'	T	+	Tampão Neb4 (10x)	2		244
					Mbol (5 U/ μ L)	1		168
			G	-	H ₂ O	2		76
					Produto de PCR	15		
rs2070744 <i>eNOS</i>	NaeI	5'...GCCGGC...3' 3'...CGGCCG...5'	C	+	NaeI (10 U/ μ L)	0,5		248
					H ₂ O	4,5		158
			T	-	Produto de PCR	15		90
rs2333227 <i>MPO</i>	AclI	5'...CCGC...3' 3'...GGCG...5'	G	+	Tampão R ⁺ (10x)	2		289
					AclI (10 U/ μ L)	0,5		169
			A	-	H ₂ O	2,5		120
					Produto de PCR	15		61
rs1801133 <i>MTHFR</i>	HinfI	5'...GANTC...3' 3'...CTNAG...5'	T	+	Tampão R ⁺ (10x)	2		198
					HinfI (10 U/ μ L)	0,5		175
			C	-	H ₂ O	2,5		
					Produto de PCR	15		23

N- qualquer nucleótido; Seta – local de clivagem da enzima de restrição

Anexo IX - Determinação dos genótipos/fenótipos da haptoglobina

Preparou-se o gel adicionando 14mL do tampão do gel (36mg Tris em 100 mL de H₂O e acertando o pH com HCl 5M para um valor de pH 8,9), 14mL de solução acrilamida/bisacrilamida (28g de acrilamida e 0,735g de bis-acrilamida em 100ml de H₂O), 21mL de H₂O, 350 µL de TEMED e 1mL de persulfato de amônio 12mg/mL que inicia a polimerização. A solução foi introduzida entre duas placas de vidro preparadas para a polimerização do gel, ficando este a solidificar durante 30 minutos.

As amostras para aplicação no gel foram preparadas adicionando-se 15µL de hemoglobina (obtida a partir de sangue do cordão umbilical) e 15µL de sacarose (40g/100mL) a 20µL de plasma dos doentes, para um volume final de 45µL. Aplicou-se 10µL de cada amostra no gel, introduziram-se as placas com o gel numa tina de eletroforese com tampão Tris/glicina (18g de TRIS e 86,4g de glicina em 3 L de H₂O, acertando o pH com HCl 5M para um valor de pH 8,3). As condições de eletroforese são 190 volts durante 4 horas mantendo a temperatura inferior a 4°C.

Para a coloração das bandas resultantes da eletroforese foi utilizado o método da coloração por contacto, utilizando-se uma solução de o-dianisidina (50mg de o-dianisidina em 10 mL ácido acético 50% (v/v)) sobre um papel de filtro colocado no gel durante 3 minutos seguido de peróxido de hidrogénio (200 µL de H₂O₂ em 9,8 mL de H₂O) nas mesmas condições (Figura IX-1).

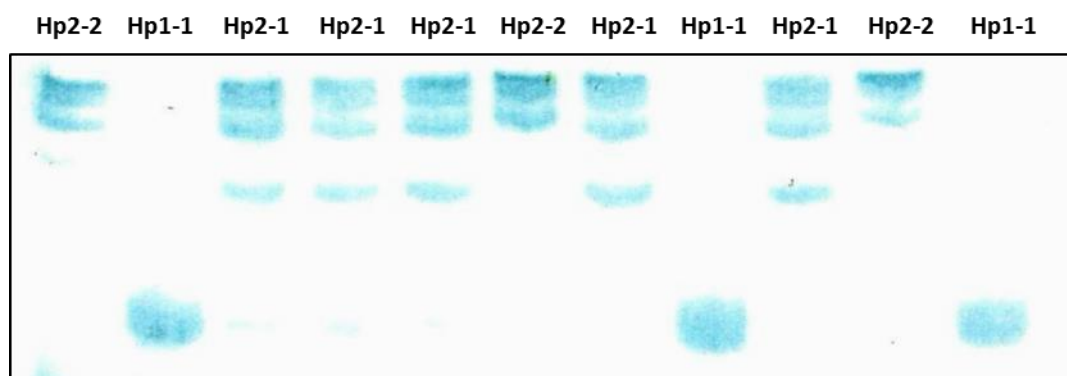


Figura IX-1- Imagem exemplificativa dos principais fenótipos da haptoglobina (Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2) em gel de poliacrilamida.

Anexo X - Atividade da fosfatase ácida

Prepararam-se 4 tubos de ensaio (2 brancos aos 0 e 30 minutos- B0 e B30 e 2 amostras aos 0 e 30 minutos – A0 e A30) e adicionou-se a cada um destes 450 µL de pNPP em tampão citrato (pNPP 10 mM em tampão citrato de sódio 200mM pH6.0). Incubaram-se os tubos em banho-maria a 37°C durante 5 minutos com agitação. Após este período adicionou-se 50 µL de glóbulos vermelhos lavados, previamente hemolisados em mercaptoetanol a 10%, aos tubos A0 e A30. Retiraram-se os tubos 0 (A0 e B0) do banho e colocaram-se em gelo e os restantes tubos (30minutos) foram incubados com agitação a 37° C durante 30 minutos. Adicionou-se 1 mL de NaOH 600mM aos tubos 0 (B0 e T0). Adicionou-se ao tubo B0 50 µL de glóbulos vermelhos hemolisados. Agitaram-se os tubos 0 e leram-se as absorvências a 405nm no espectrofotômetro utilizando como branco o tampão citrato 200mM pH=0,6. Após os 30 minutos de incubação, colocaram-se os tubos dos 30 minutos em gelo e adicionou-se 1 mL de NaOH 600mM. Adicionou-se posteriormente 50 µL de hemolisado ao tubo B30. Agitaram-se os tubos e leram-se as absorvências a 405nm tal como anteriormente.

A atividade da enzima foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Atividade: } \frac{(A_{30}-B_{30})-(A_0-B_0)}{30} * \frac{30*60*40}{\text{AbsHb}*35,714*40*\epsilon} \Leftrightarrow \frac{(A_{30}-B_{30})-(A_0-B_0)}{\epsilon} * \frac{60}{\text{AbsHb}*35,714}$$

Unidades=µmol/g Hb/h

Em que:

$((A_{30}-B_{30})-(A_0-B_0))/30$	Variação da absorvência nos 30 minutos de reação, tendo em conta a redução não enzimática do p-NPP
30	Diluição do hemolisado (1/40) no ensaio:0,1mL/3mL
60	Fator de conversão do intervalo de 1 minuto num intervalo de 1 hora.
40	Diluição dos glóbulos para o ensaio da Hb (0,1mL/0,4mL)
AbsHb	Absorvência da Hb
35,714	Transforma a absorvência da Hb em gramas de Hb
40	Diluição dos glóbulos para o ensaio da FA
ϵ	Constante que transforma a variação da absorvência em variação de pNP (0,018µM ⁻¹ cm ⁻¹)

Anexo XI - Atividade da redutase da metahemoglobina

Cada análise conteve, por ordem de adição, 100 µL de solução tampão Tris-EDTA a pH 8.0, 100 µL de ferricianeto de potássio a 2mM, 100 µL de NADH a 2 mM, 680 µL de H₂O desionizada e 20 µL de suspensão de eritrócitos em mercaptoetanol a 10%. Utilizou-se como referência uma solução padrão contendo a mesma quantidade de tampão, ferricianeto de potássio e de NADH e 700 µL de H₂O desionizada. A reação foi monitorizada para o decréscimo da absorvência a 340 nm num espectrofotômetro durante 3 minutos a 37° C. Todas as leituras foram realizadas em duplicado.

Para a determinação da concentração de Hb, aos glóbulos lavados adicionou-se 20 µL a 5mL de solução de Drabkin (0,6M ferrocianeto de potássio, 0,7M cianeto de potássio, e 0,012M hidrogenocarbonato de sódio), agitou-se e incubou-se no escuro durante 10 minutos. Leu-se a absorvência a 540nm (solução de Dradkin como branco). Determinou-se a concentração de Hb através de uma curva de calibração.

Para a determinação da atividade da RMHb utilizou-se uma fórmula derivada da lei de Lambert-Beer ($Abs = \epsilon cd$):

$$\text{Atividade: } \frac{\Delta Abs_{340} \times vol \text{ cuvette}}{\epsilon \times d \times \Delta T \times vil \text{ amostra} \times [Hb]} \times FD$$

Unidades= µmol/g Hb/min

Em que:

ΔAbs_{340}	Variação da absorvência no ensaio lida a 340 nm
Vol cuvette	Volume da cuvette, L
Vol amostra	Volume da amostra utilizada no ensaio no ensaio, mL
ϵ	Coeficiente de extinção molar da hemoglobina a 340 nm, L/µmol/cm
d	Distância do percurso, cm (cuvete de 1 cm)
ΔT	Variação do tempo entre a leitura das absorvências, min
[Hb]	Concentração da hemoglobina da amostra a 540 nm, g/mL
FD	Fator de diluição da hemoglobina no ensaio

Anexo XII - Atividade da redutase transmembranar

De forma a determinar a atividade da RTM, foi necessário calcular o coeficiente de absorvidade do ferrocianeto (ϵ). Este valor foi obtido através de uma curva de calibração, que é efetuada sempre que é preparada uma nova solução de cloreto férrico ou de batofenantrolina. Para tal, dissolveram-se 0,002 g de ferrocianeto de potássio em 100 ml de água desionizada e prepararam-se várias diluições desta solução em tubos de ensaio de 10 ml, para um volume final ajustado de 700 μ l. Preparou-se uma mistura reacional e adicionaram-se a cada um dos tubos, 300 μ l desta mesma mistura, agitando-os no vórtex e colocando-os depois ao escuro durante 5 minutos. Realizou-se a leitura da conversão de ferricianeto a ferrocianeto das diferentes soluções a 535 nm num espectrofotómetro e registaram-se os valores verificados, efetuando posteriormente a curva de calibração, sendo que, o valor do coeficiente de absorvidade do ferrocianeto foi dado pelo declive da reta obtida.

Preparam-se 4 tubos de ensaio (2 brancos aos 0 e 20 minutos- B0 e B20 e 2 amostras aos 0 e 20 minutos – A0 e A20) e adicionou-se a cada um destes 700 μ l de tampão fosfato salino 0.1 M e 37,5 μ l de eritrócitos, obtidos no passo anterior. Colocam-se os tubos de ensaio numa incubadora durante 5 minutos a 37° C com agitação constante. Após a incubação adicionaram-se 12,5 μ l de Ferricianeto de Potássio 0,1 M em NaCl 0,9 % (v/v) aos tubos A0 e A20 e centrifugaram-se os tubos B0 e A0 a 2000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Retiraram-se 350 μ l de sobrenadante dos tubos B0 e A0 para um novo tubo de ensaio devidamente identificado. Enquanto se procedeu o passo anterior, continuou a incubação dos tubos B20 e A20 por mais 20 minutos. Terminando esse período centrifugaram-se estes tubos a 2000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Retiram-se 350 μ l de sobrenadante dos tubos B20 e A20 para um novo tubo de ensaio devidamente identificado. Adicionam-se 6,25 μ l de Ferricianeto de Potássio 0,1 M em NaCl 0,9 % (v/v) aos novos tubos de ensaio contendo o sobrenadante de B0 e B20. Incubou-se o tubo de B20 durante 20 minutos a 37° C com agitação constante e armazenaram-se os tubos contendo os sobrenadantes de B0, A0 e A20 a 4° C. Para efetuar as leituras da atividade da RTM, colocaram-se 700 μ l de H₂O e 300 μ l de mistura reacional (2 porções de acetato de sódio 3M pH 6, 2 porções de ácido cítrico 0,2 M, 1 porção de cloreto férrico 0,0033 M (em ácido acético 0,1 M) e 1 porção de Batofelantrolina (6.74×10^{-3} M) num tubo de ensaio correspondente ao branco e 600 μ l de H₂O, 300 μ l de mistura reacional e 100 μ l do respetivo sobrenadante em tubos de ensaio devidamente identificados como B0, A0, B20 e A20. Agitaram-se os tubos, colocando-os em seguida no escuro durante 5 minutos. Leram-se as absorvências a 535 nm num espectrofotómetro e registam-se os valores observados.

A determinação do hematócrito foi feita fazendo passar a solução de glóbulos vermelhos lavados no início do método experimental, por um tubo capilar específico para hematócrito. Centrifugam-se os capilares durante 7 minutos numa microcentrífuga a 15250 G e determinou-se o volume das células relativamente ao volume total de suspensão, comparando a altura da coluna de células com a altura da coluna de líquido, com o auxílio de um cartão de leitura manual de hematócrito.

A atividade da enzima foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Atividade: } \frac{1 - \frac{\text{hematócrito}}{20}}{\frac{\text{hematócrito}}{20}} \times 3 \frac{(A_{20} - B_{20}) - (A_0 - A_{20})}{\varepsilon(\text{ferrocianeto})}$$

Unidades= mmol ferrocianeto/l/hora

$(A_{20} - B_{20}) - (A_0 - A_{20})$	Diferença do valor das absorvências medidas no tempo 20min de incubação e as absorvências medidas no tempo 0
ε (ferrocianeto)	Coefficiente de correlação do ferrocianeto que foi determinado a partir da curva de calibração (declive da reta da curva de calibração)

Anexo XIII – Estatística descritiva dos parâmetros estudados (meses 0, 1, 3 e 6) e teste de normalidade

Tabela XIII-1 - Estatística descritiva dos parâmetros hemoglobina, HbS, bilirrubina, LDH, RDW, reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, FA, MPO, RMHb e RTM ao longo dos meses de toma de citrulina e teste de normalidade Shapiro-Wilk

Parâmetros	Mês	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Valor p* (Teste de normalidade Shapiro-Wilk)
Hemoglobina (g/dL)	0	12	8,68	8,90	6,30	11,50	1,55	0,943
	1	10	8,46	8,35	7,00	11,00	1,09	0,168
	3	9	8,30	8,60	5,70	12,10	1,79	0,213
	6	7	8,32	8,40	6,40	11,30	1,61	0,389
HbS (%)	0	11	76,11	77,00	62,80	88,0	8,14	0,797
	1	7	79,54	77,90	69,40	88,70	6,82	0,797
	3	7	81,20	80,90	76,40	88,00	4,58	0,523
	6	6	80,53	78,00	76,00	89,00	5,59	0,077
Bilirrubina (mg/dL)	0	12	2,40	1,81	1,26	5,57	1,52	0,001
	1	8	1,94	1,79	0,97	3,40	0,83	0,595
	3	7	1,82	2,13	1,00	2,59	0,66	0,171
	6	7	2,26	2,28	1,50	3,15	0,53	0,989
LDH	0	11	468,18	451	328	793	127,09	0,031
	1	9	460,77	457	305	652	118,63	0,636
	3	9	516,77	519	275	774	180,13	0,545
	6	5	491,00	505	343	690	130,69	0,673
RDW	0	10	21,99	22,05	17,20	25,70	2,32	0,790
	1	8	24,63	24,35	22,3	26,5	1,62	0,260
	3	6	24,16	24,15	21,00	27,50	2,59	0,543
	6	7	22,97	23,10	19,00	27,70	2,78	0,701
Reticulócitos	0	12	6,92	6,00	2,14	12,38	3,39	0,333
	1	10	9,07	8,56	5,07	17,70	3,93	0,195
	3	9	7,82	8,46	4,34	12,90	2,84	0,580
	6	7	7,37	7,16	5,60	9,90	1,56	0,496
Leucócitos	0	10	13640	1045	7000	33100	7448,98	0,001
	1	8	13412,50	12050	7000	25900	6147,57	0,300
	3	8	12514,29	9400	8200	21900	5283,44	0,073
	6	7	10328,57	10400	7100	13500	2443,85	0,602
Neutrófilos	0	10	5101,50	5007,50	1580	8610	2107,34	0,978
	1	8	6579,00	5806	1860	12020	3851,72	0,478
	3	8	5711,43	3520	2510	11360	3394,45	0,132
	6	7	5283,71	5040	3200	8420	2070,13	0,304
FA (μmol/g Hb/h)	0	14	368,61	347,10	217,74	605,44	107,1	0,585
	1	7	382,06	412,62	255,80	478,07	86,53	0,430
	3	2	239,09	239,09	226,70	251,49	17,53	--
	6	6	381,31	355,13	295,60	529,58	81,86	0,296
MPO (ng/mL)	0	14	37,45	29,56	14,14	78,63	18,58	0,162
	1	5	38,88	30,08	11,67	62,92	22,70	0,271
	3	4	33,47	36,00	15,87	46,01	12,68	0,559
	6	4	52,53	54,25	38,65	62,97	10,20	0,716
RMHb (μmol/g Hb/min)	0	13	23,96	21,90	12,40	48,55	9,44	0,071
	1	7	21,61	20,84	12,89	30,54	6,66	0,678
	3	2	25,44	25,44	20,13	30,74	7,49	--
	6	6	23,71	21,79	16,49	37,88	7,40	0,087
RTM (mmol/lcel/h)	0	4	5,17	4,90	4,21	6,65	1,05	0,485
	1	4	3,71	3,81	2,99	4,22	0,51	0,475
	3	3	4,32	4,99	2,93	5,05	1,20	0,045
	6	3	5,24	4,70	4,41	6,62	1,19	0,230

*Considera-se a distribuição normal quando $p \geq 0,05$; -- - Valor incapaz de ser calculado

Anexo XIV - Correlações entre os parâmetros estudados normalizados e o tempo da toma do suplemento citrulina

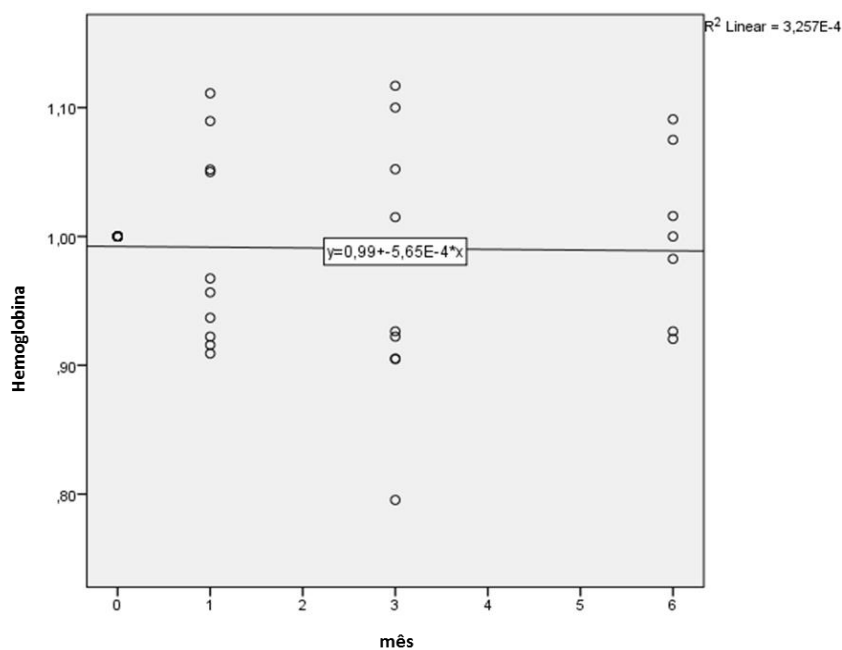


Figura XIV-1- Correlação entre os níveis de hemoglobina normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina ($p=0,803$; coeficiente de correlação= $-0,042$)

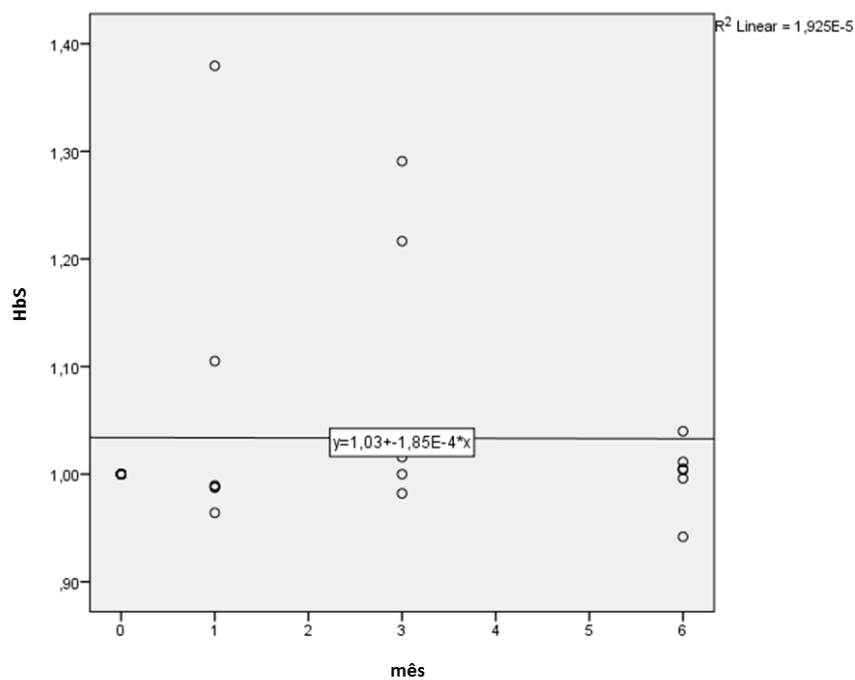


Figura XIV-2- Correlação entre os níveis de HbS normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina ($p=0,306$; coeficiente de correlação= $0,201$).

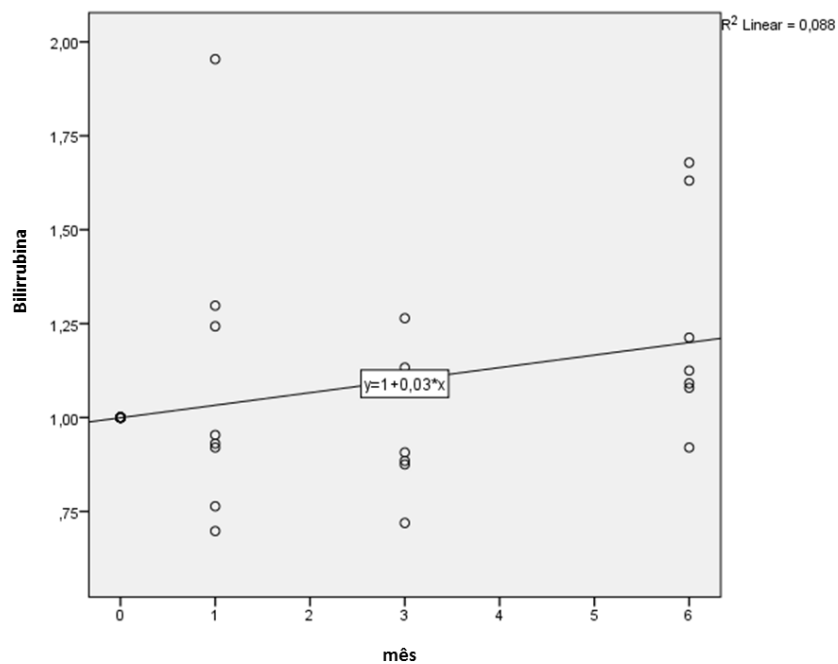


Figura XIV-3 - Correlação entre os níveis de bilirrubina normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina ($p=0,198$; coeficiente de correlação= $0,226$)

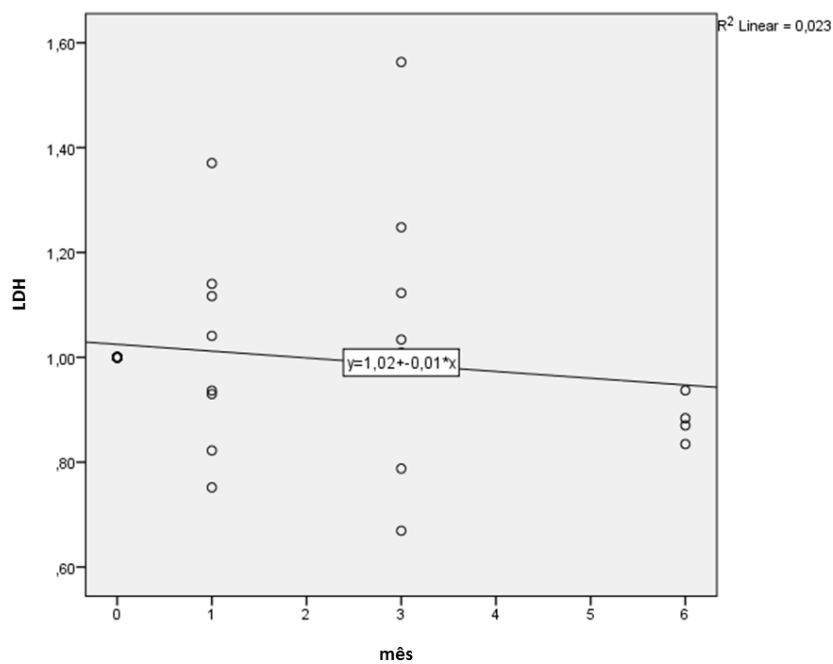


Figura XIV-4 - Correlação entre os níveis de LDH normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina ($p=0,307$; coeficiente de correlação= $-0,189$).

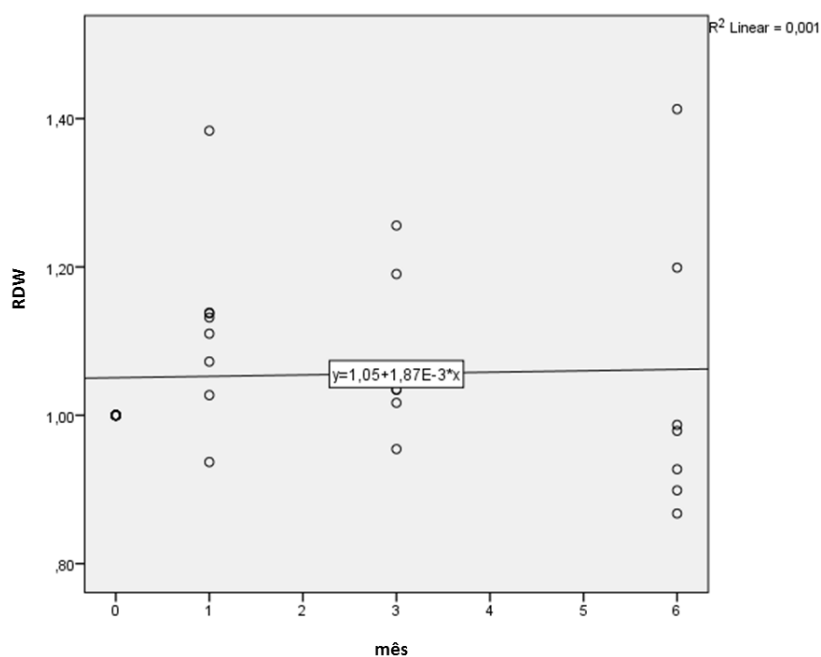


Figura XIV-5 - Correlação entre os níveis de RDW normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina ($p=0,957$; coeficiente de correlação=0,010).

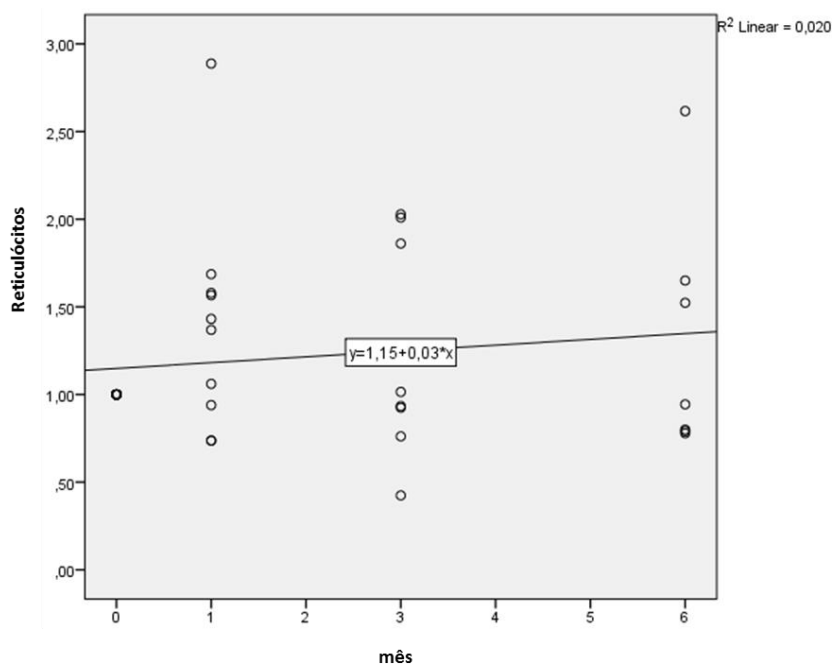


Figura XIV-6 - Correlação entre os níveis de reticulócitos normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina ($p=0,878$; coeficiente de correlação=0,026)

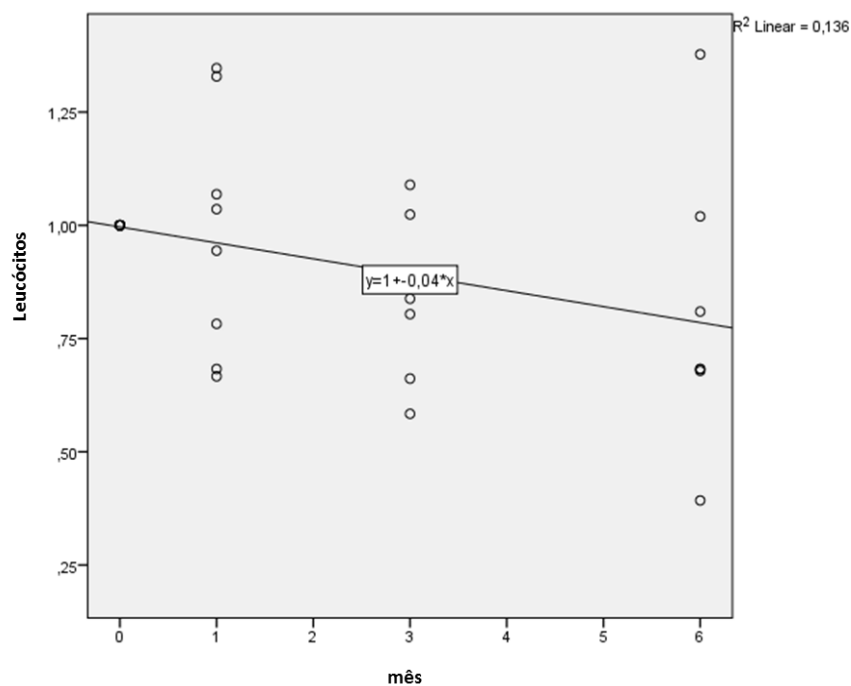


Figura XIV-7 - Correlação entre os níveis de leucócitos normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina ($p=0,075$; coeficiente de correlação= $-0,320$).

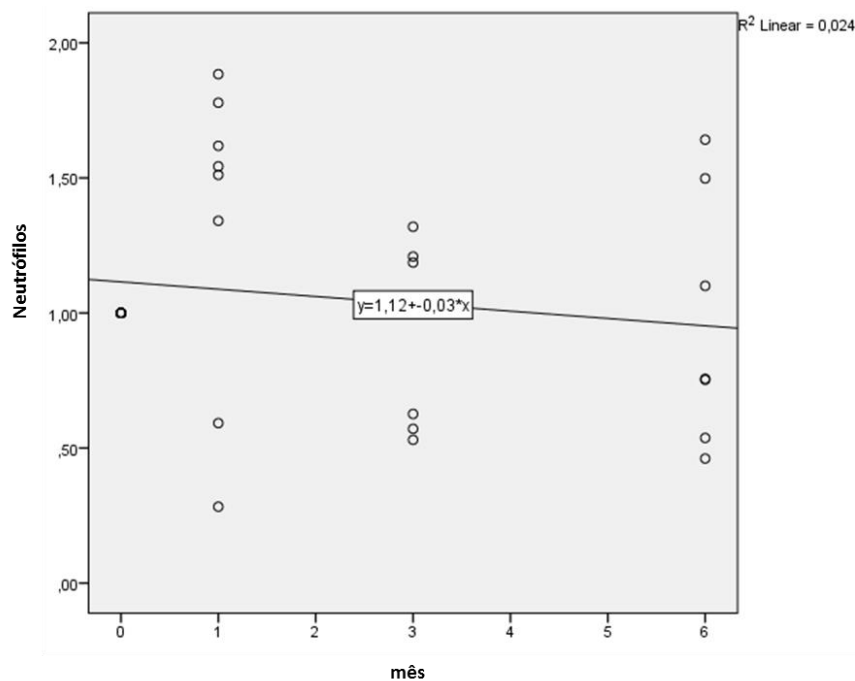


Figura XIV-8 - Correlação entre os níveis de neutrófilos normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento Citrulina ($p=0,784$, coeficiente de correlação= $-0,050$).

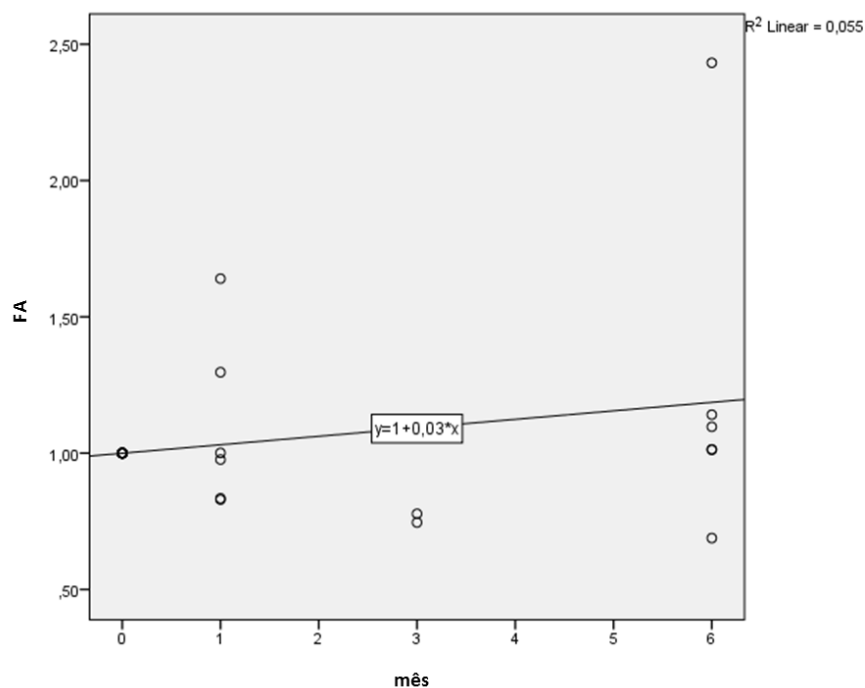


Figura XIV-9 - Correlação entre os níveis de FA normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina ($p=0,284$; coeficiente de correlação=0,210).

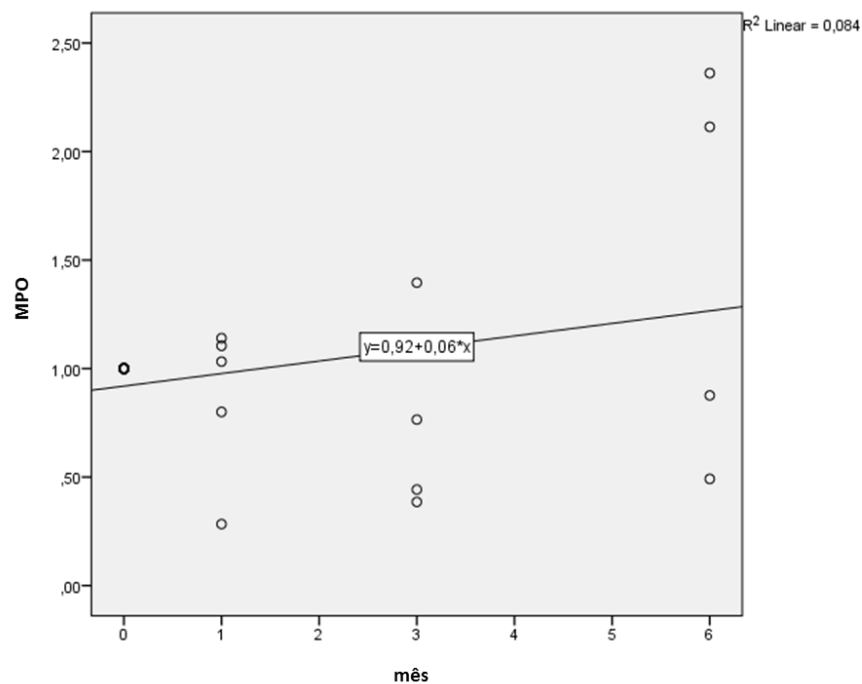


Figura XIV-10 - Correlação entre os níveis de MPO normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina ($p=0,742$; coeficiente de correlação=0,066).

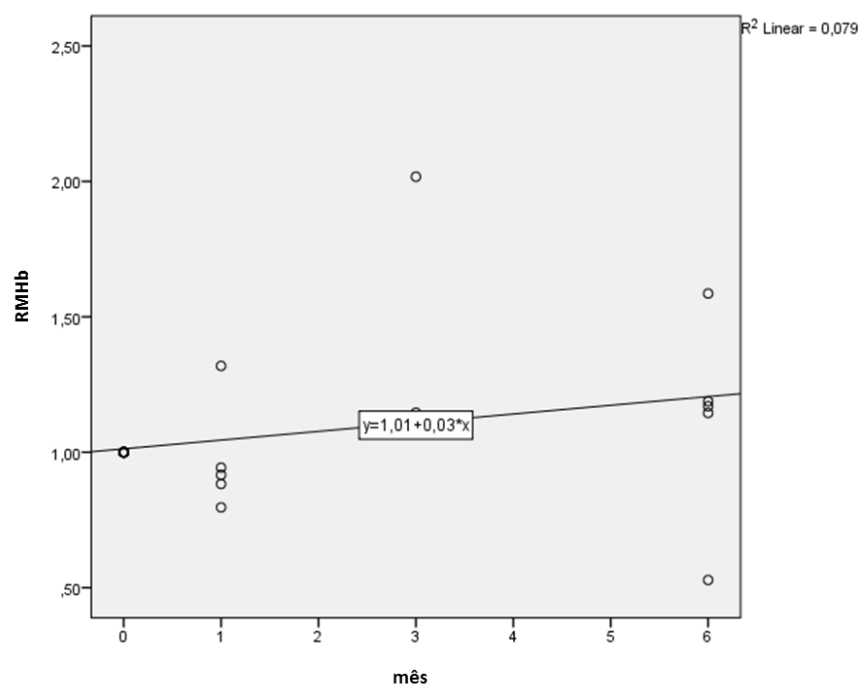


Figura XIV-11 - Correlação entre os níveis de RMHb normalizados e o tempo (meses) da toma do suplemento citrulina ($p=0,139$; coeficiente de correlação= $0,305$).